前　言

细胞生物学是生命科学中一门发展十分迅速的重要基础学科。从细胞学的诞生到细胞生物学，按其自然发展经历了细胞显微、亚显微和分子三个水平的发展时期。细胞学是从显微和亚显微两个结构层次上研究细胞；细胞生物学是细胞学发展的高级阶段，发展到从分子水平研究细胞，从显微、亚显微、分子水平三个结构层次上研究细胞结构和功能以阐明生命活动基本规律的各个方面。由于细胞是生命的基本单位，一切生命现象都要从细胞中获得答案，因此，它是生命科学中一个核心部分。近半个世纪以来，在研究细胞的结构与功能、揭示生命奥秘所取得的一系列突破性进展是自然科学中的伟大成就，对人类的健康和生存，对生物的控制、利用和改造都有重要作用。当今世界面临着人口爆炸、环境污染、粮食危机、资源匮乏的严重挑战，对此，生命科学的地位和作用日益突出重要，其中细胞生物学的作用也不容忽视。

我国高等院校早已将细胞生物学列为生物学及其相关专业必修课或选修课，一些各有侧重和特色的细胞生物学教材相继问世。但从我国高等教育蓬勃发展和教改形势的要求来看，仍感不足。高教出版社希望有一本字数较少、质量较高的本科生教材，并约请我们承担这项任务。我们分析了国内外20世纪80年代以来出版的细胞生物学和分子细胞生物学教材，根据我校多年的教学经验和体会确定了本书的特点和编写原则。

(1) 本书内容以真核细胞的结构与功能为重点，突出现代细胞生物学最主要的基本内容，由表及里、由结构到功能、按自然的内在联系依次介绍：细胞膜、细胞内膜系统(包括各种具膜细胞器)、细胞骨架、细胞核与染色体、细胞增殖、分化、细胞信号系统、细胞的衰老死亡以及细胞的起源与演化。这些部分相互联系、相互作用、协调地完成各种生命活动。使学生对细胞的主要结构与功能及其复杂关系和作用以及细胞的起源与演化等有一较系统而全面的了解和认识。

(2) 在各章对细胞的主要结构与功能的阐述，由浅入深，一般由显微、亚显微到分子的结构与功能，尽量联系到学科的前沿或热点，介绍较先进的科学结论。在重要的基本问题方面，有些还跟踪国际上最新进展，力求能反映出最先进的科研成果。当我们的书稿完成后正在校稿时，正值人类基因组图谱公布，于是引用了其中一些有关的工作，确感其内容焕然一新。有些内容也联系到作者自己的科研工作结果，并提供照片。

(3) 注意在重要的基本内容方面尽可能作到理论联系实际。

(4) 注意启发性，对某些较复杂内容常提出一些问题或不同看法，或提示一点解决问题的思路，以促进学生思考。在每章之后列出较详细的内容提要及思考题，引导学生掌握基本内容并学习如何钻研问题。

(5) 注意可读性，除了对各部分内容叙述注意系统性、逻辑性以外，文字力求简明、通顺，深入浅出。

由于细胞生物学内容十分广博复杂，我们决定由多作者撰写。参加撰写人员多为从事有关教学与科研多年的教师，也有新秀。撰写分工：第1章绪论(刘凌云教授)；第2章细胞生物学的研究方法(薛绍白教授、张鸿卿教授)；第3章细胞(质)膜和第4章细胞内膜系统

(刘凌云教授);第5章线粒体与叶绿体(柳惠图教授;李杰芬教授写叶绿体);第6章细胞骨架(张鸿卿教授);第7章细胞核与染色体(柳惠图教授;刘凌云教授写染色质、染色体);第8章细胞增殖及其调控(柳惠图教授;刘凌云教授写减数分裂);第9章细胞分化(王端顺教授);第10章细胞的信号系统和第11章细胞的衰老与死亡(薛绍白教授、桑建利教授);第12章细胞的起源与演化(彭奕欣教授)。

本书还有由李素文教授主编的配套实验教材《细胞生物学实验指导》。

限于我们的水平,书中不妥以至错漏之处在所难免,欢迎读者批评指正。

高等教育出版社林金安、吴雪梅二位同志对本书的出版提出了许多宝贵意见和建议,对书中插图的绘制和安排均付出了辛勤的劳动。没有他们的努力这本书是难以问世的。作者对他们致以衷心的谢意。

主 编

2001年4月

目　录

第1章　绪　论 …… (1)

1.1　细胞生物学及其在生命科学中的地位 …… (1)

1.1.1　细胞生物学研究的对象和内容 …… (1)

1.1.2　细胞生物学在生命科学中的地位 …… (2)

1.2　细胞生物学发展简史 …… (2)

1.2.1　细胞的发现和细胞学说的建立 …… (2)

1.2.2　细胞学发展的显微水平时期 …… (3)

1.2.3　细胞学发展的亚显微水平时期 …… (4)

1.2.4　细胞生物学的形成和发展 …… (5)

1.3　细胞生物学研究的实践意义 …… (7)

1.3.1　医药方面 …… (7)

1.3.2　农业方面 …… (9)

内容提要 …… (9)

思考题 …… (10)

参考资料 …… (10)

第2章　细胞生物学的研究方法 …… (11)

2.1　光学显微镜技术 …… (11)

2.1.1　普通复式光学显微镜术 …… (11)

2.1.2　相差显微镜术和微分干涉显微镜术 …… (12)

2.1.3　荧光显微镜术 …… (13)

2.1.4　视频反差增强显微镜术 …… (13)

2.1.5　激光扫描共焦显微镜术 …… (14)

2.1.6　定量细胞化学技术 …… (14)

2.2　电子显微镜技术 …… (15)

2.2.1　透射电子显微镜术及超薄切片技术 …… (15)

2.2.2　扫描电子显微镜术 …… (15)

2.2.3　扫描隧道显微镜术 …… (16)

2.3　细胞培养 …… (16)

2.4　细胞及其组分的分离和纯化 …… (17)

2.4.1　从组织中分离出不同类型的细胞 …… (17)

2.4.2　用超速离心机分离细胞器和大分子 …… (17)

2.5 放射自显影技术 …… (19)
2.6 单克隆抗体 …… (20)
2.7 重组 DNA 技术 …… (21)
2.7.1 目的基因的获取 …… (21)
2.7.2 核酸杂交构成重组 DNA …… (22)
2.7.3 重组 DNA 导入受体细胞 …… (23)
2.7.4 筛选含有重组 DNA 分子的受体细胞 …… (24)
内容提要 …… (24)
思考题 …… (25)
参考资料 …… (25)

第 3 章 细胞(质)膜 …… (26)
3.1 膜的分子结构 …… (26)
3.1.1 流体镶嵌模型 …… (27)
3.1.2 膜脂双层 …… (28)
3.1.3 膜蛋白 …… (31)
3.1.4 膜蛋白与膜脂的结合方式 …… (33)
3.1.5 膜的流动性 …… (37)
3.2 细胞被(细胞表面) …… (44)
3.2.1 概 念 …… (44)
3.2.2 细胞被与分子识别 …… (45)
3.2.3 细胞被与血型抗原 …… (46)
3.3 通过膜的物质运输 …… (47)
3.3.1 被动运输 …… (48)
3.3.2 主动运输 …… (56)
3.3.3 内吞作用和外排作用 …… (59)
内容提要 …… (70)
思考题 …… (72)
参考资料 …… (73)

第 4 章 细胞内膜系统 …… (74)
4.1 细胞内的房室化和蛋白质的分选 …… (74)
4.1.1 房室化中蛋白质的重要作用 …… (74)
4.1.2 蛋白质的分选和运输途径 …… (75)
4.1.3 两种类型的分选信号 …… (76)
4.2 胞液(细胞质基质) …… (77)
4.2.1 胞液的概念和组成 …… (77)
4.2.2 胞液的功能 …… (77)

4.3 内质网……(79)
4.3.1 内质网的形态结构和类型……(80)
4.3.2 内质网的功能……(84)
4.4 高尔基器……(95)
4.4.1 高尔基器的形态结构……(96)
4.4.2 高尔基器的功能……(98)
4.5 溶酶体……(102)
4.5.1 溶酶体的形态结构……(102)
4.5.2 溶酶体的形成……(104)
4.5.3 溶酶体的功能……(107)
4.5.4 溶酶体与疾病……(109)
4.6 过氧物酶体……(111)
4.6.1 过氧物酶体的结构与功能……(111)
4.6.2 过氧物酶体的发生……(113)
内容提要……(114)
思考题……(117)
参考资料……(118)

第5章 线粒体与叶绿体……(119)
5.1 线粒体……(119)
5.1.1 线粒体的形态、大小、数量和分布……(119)
5.1.2 线粒体的结构……(121)
5.1.3 线粒体的功能与氧化磷酸化……(122)
5.1.4 线粒体是一个半自主性的细胞器……(129)
5.1.5 线粒体的增殖……(136)
5.1.6 线粒体与疾病……(136)
5.2 叶绿体……(138)
5.2.1 叶绿体的结构……(138)
5.2.2 叶绿体的主要功能——光合作用……(141)
5.2.3 叶绿体 DNA……(147)
内容提要……(150)
思考题……(151)
参考资料……(151)

第6章 细胞骨架……(152)
6.1 微 丝……(152)
6.1.1 微丝的成分及组装……(152)
6.1.2 微丝结合蛋白……(156)

6.1.3 微丝的功能 …… (158)
6.2 微 管 …… (164)
6.2.1 微管的形态结构 …… (164)
6.2.2 微管的成分与组装 …… (165)
6.2.3 微管组织中心 …… (166)
6.2.4 微管的功能 …… (167)
6.3 中等纤维 …… (171)
6.3.1 中等纤维的化学组成 …… (171)
6.3.2 中等纤维的组装 …… (172)
6.3.3 中等纤维的功能 …… (174)
内容提要 …… (175)
思考题 …… (176)
参考资料 …… (176)

第 7 章 细胞核与染色体 …… (177)
7.1 核被膜与核孔复合物 …… (178)
7.1.1 核被膜与核孔复合物的结构 …… (178)
7.1.2 核孔复合物的功能——核质分子双向选择性交换通道 …… (178)
7.1.3 核纤层的结构与功能 …… (182)
7.2 染色质 …… (183)
7.2.1 染色质 DNA …… (183)
7.2.2 染色质蛋白 …… (188)
7.2.3 染色质结构的基本单位——核小体 …… (190)
7.2.4 核小体链如何形成 30 nm 染色质纤维 …… (193)
7.2.5 常染色质和异染色质 …… (194)
7.3 染色体 …… (195)
7.3.1 染色体结构模型 …… (195)
7.3.2 染色体的数目、形态和类型 …… (197)
7.3.3 染色体 DNA 的关键序列和人工染色体 …… (204)
7.3.4 核型和染色体带型 …… (207)
7.3.5 巨型染色体 …… (208)
7.4 核 仁 …… (212)
7.4.1 核仁的超微结构 …… (212)
7.4.2 核仁周期 …… (214)
7.4.3 核仁的功能——核蛋白体的生物发生 …… (214)
7.5 核基质(核骨架) …… (217)
7.6 真核细胞基因表达在转录水平上的调控 …… (219)
7.6.1 启动子与增强子——基因调控的顺式作用元件 …… (220)
7.6.2 转录因子——基因调控的反式作用因子 …… (221)

7.6.3 转录因子被激活的途经 …… (229)
7.6.4 染色质结构与基因转录水平的调控 …… (229)
内容提要 …… (231)
思考题 …… (234)
参考资料 …… (234)

第8章 细胞增殖及其调控 …… (236)
8.1 细胞周期概述 …… (236)
8.2 细胞同步化 …… (237)
8.2.1 自然同步化 …… (238)
8.2.2 人工同步化 …… (238)
8.3 细胞周期时相的主要事件 …… (239)
8.3.1 细胞周期检验点 …… (239)
8.3.2 G_1 期 …… (241)
8.3.3 S 期 …… (242)
8.3.4 G_2 期 …… (245)
8.4 有丝分裂 …… (245)
8.4.1 前 期 …… (246)
8.4.2 前中期 …… (248)
8.4.3 中 期 …… (248)
8.4.4 后 期 …… (249)
8.4.5 末 期 …… (251)
8.4.6 胞质分裂 …… (251)
8.5 减数分裂 …… (254)
8.5.1 减数分裂的 3 种类型 …… (254)
8.5.2 减数分裂过程及各期特征 …… (254)
8.6 细胞增殖调控因素 …… (261)
8.6.1 细胞周期引擎分子 Cdk 激酶和周期蛋白及相关周期调节蛋白与细胞增殖调控 …… (261)
8.6.2 生长因子 …… (272)
8.6.3 癌基因与细胞增殖 …… (276)
8.6.4 抑癌基因与细胞增殖 …… (280)
内容提要 …… (283)
思考题 …… (284)
参考资料 …… (284)

第9章 细胞分化 …… (286)
9.1 细胞决定 …… (286)

9.1.1　细胞分化的潜能与决定 …… (287)
9.1.2　卵细胞质在早期胚胎细胞决定中的重要性 …… (287)
9.1.3　细胞决定的稳定性和遗传性 …… (289)
9.2　胚胎细胞分化 …… (289)
9.2.1　细胞核和细胞质相互作用 …… (289)
9.2.2　胚胎诱导对细胞分化的作用 …… (290)
9.2.3　激素对细胞分化的调节 …… (296)
9.3　同源盒基因复合物的结构同系物在调节细胞分化中的共性 …… (297)
9.3.1　同源盒序列编码的蛋白质 …… (297)
9.3.2　*HOM* 基因与 *Hox* 基因间的结构同系物的共同特征 …… (298)
9.4　细胞分化与动物组织的维持 …… (300)
9.4.1　干细胞增殖与分化 …… (300)
9.4.2　细胞凋亡在胚胎发育及组织维持中的作用 …… (302)
9.5　细胞分化的机理 …… (302)
9.5.1　细胞分化与基因组变化 …… (302)
9.5.2　细胞分化与特异蛋白基因表达的调节 …… (305)
内容提要 …… (309)
思考题 …… (310)
参考资料 …… (310)

第 10 章　细胞的信号系统 …… (312)
10.1　细胞间信号分子传递信号的方式 …… (312)
10.1.1　膜结合信号分子的信号传递 …… (312)
10.1.2　间隙连接中信号分子的信号传递 …… (312)
10.1.3　分泌信号分子的信号传递 …… (313)
10.2　信号分子与靶细胞效应 …… (315)
10.2.1　信号分子类型 …… (315)
10.2.2　信号分子具有的特异性 …… (315)
10.2.3　每种类型的细胞受到多种信号的调控 …… (316)
10.2.4　不同细胞对相同信号的反应各异 …… (317)
10.3　蛋白质的可逆磷酸化与信号传递 …… (317)
10.4　胞内受体介导的信号传递 …… (318)
10.5　细胞表面受体介导的信号传递 …… (320)
10.5.1　连接离子通道受体的信号传递 …… (320)
10.5.2　连接 G 蛋白受体的信号传递 …… (321)
10.5.3　酶连受体的信号传递 …… (330)
10.5.4　与酪氨酸蛋白激酶结合的受体 …… (335)
10.6　细胞信号转导通路间的相互关系 …… (336)
内容提要 …… (337)

思考题……(338)
参考资料……(338)

第 11 章 细胞的衰老与死亡……(340)
11.1 细胞的衰老……(340)
11.1.1 离体培养细胞的衰老现象……(340)
11.1.2 衰老细胞的变化……(340)
11.1.3 细胞衰老的机制……(341)
11.1.4 细胞衰老研究的常用方法……(343)
11.2 细胞的死亡……(343)
11.2.1 细胞坏死与细胞凋亡的比较……(343)
11.2.2 细胞凋亡的生物学意义……(345)
11.2.3 细胞凋亡的分子机制……(346)
内容提要……(349)
思考题……(350)
参考资料……(350)

第 12 章 细胞的起源与演化……(351)
12.1 从分子到原始细胞……(351)
12.1.1 原始地球的条件……(351)
12.1.2 星际分子和深海热泉……(352)
12.1.3 原始生命体的可能类型……(353)
12.1.4 原始细胞的形成……(356)
12.2 从原核细胞到真核细胞……(358)
12.2.1 原始细胞的演化……(358)
12.2.2 真核细胞的起源……(360)
12.3 从单细胞生物到多细胞生物……(362)
12.3.1 生物从单细胞到多细胞的可能途径……(362)
12.3.2 细胞分化的类型和机理……(364)
内容提要……(365)
思考题……(365)
参考资料……(366)
名词索引……(367)

第1章

绪　论

1.1　细胞生物学及其在生命科学中的地位

1.1.1　细胞生物学研究的对象和内容

细胞生物学研究的对象是细胞。细胞是生物结构与功能的基本单位。也可以说，细胞是生命的基本单位(非细胞形态的病毒除外)，因此一切生命现象都要从细胞中获得答案。细胞的生命活动基本规律的研究是一切生命科学的研究基础。随着科学技术的发展和一些现代物理学、化学以及现代实验生物学技术应用于细胞的研究，对细胞结构与功能的认识不断深入、更新与拓展，特别是分子生物学的成就与技术方法的引入、渗透，深刻地影响到对细胞的研究和认识，使细胞学发展到一个新阶段——细胞生物学。细胞学主要是从显微和亚显微两个结构层次研究细胞的结构与功能，在此基础上，细胞生物学又发展到从分子水平上研究细胞的结构与生命活动。

概括地说，细胞生物学是研究细胞的结构与功能以阐明其生命活动基本规律的科学。它从细胞的显微、亚显微和分子3个结构层次及细胞间的相互关系来研究生命活动的基本规律，如增殖和生长、发育和分化、遗传和变异、兴奋传导和运动、细胞通讯、细胞识别和免疫、衰老和死亡、起源和演化等。

为什么要从3个结构层次上研究细胞，因为细胞作为整体是生命活动的基本单位，其生命活动的结构基础是细胞内高度有序且为动态的结构体系：大致可归纳为遗传信息结构体系、膜结构体系和细胞骨架结构体系，它们都是由分子组成的。细胞内许多代谢活动常是以蛋白质与蛋白质或与核酸、磷脂等组装成特定的复合物，由这些复合物构成细胞体系的结构基础和功能单位。如在遗传信息结构体系中，DNA和组蛋白组装成的核小体是染色质结构的基本单位，DNA的复制与转录是在染色质水平上进行的。核蛋白体RNA与蛋白质组装成的核蛋白体(ribosome)是蛋白质合成的场所，在进行蛋白质合成时，还与由DNA转录出的mRNA组成多聚核蛋白体，进一步又与膜系统(如内质网、高尔基器)或骨架系统相结合行使其功能活动。只有这样合成的蛋白质才能正确折叠、组装、运输，并受控于整个细胞代

谢活动，参与细胞的生命活动。如果在试管中合成的蛋白质，即使其一级结构完全与之相同，但其折叠、修饰加工以及调控等均无法与之比拟。正如膜结构系统中质膜的内在蛋白，在活细胞的脂双层中表现出不同的生物活性，如果将其从脂双层中分离出来，则失去其活性。这些说明细胞的生命活动在 3 个层次上是这 3 个结构体系按一定的严格的时空顺序、高度精密地协调活动。如果脱离细胞的整体和亚细胞结构，仅单纯从分子水平来研究，就无法解释复杂的生命现象。研究细胞的分子，也需要了解它是在细胞的哪个部位、什么结构上发生作用。

对细胞某部分内容的深入研究，发展有膜生物学（Membrane Biology）、溶酶体生物学（Biology of the Lysosome）、核学（Karyology, Caryology）、染色体学（Chromosomology, Chromosomics）、染色体生物学（Chromosome Biology）、基因组学（Genomics）、功能基因组学（Functional Genomics）、基因分子生物学（Molecular Biology of the Gene）等。根据研究内容领域的不同，则有医学细胞生物学（Medical Cell Bilogy）、癌细胞生物学（Cell Biology of Cancer）、神经细胞生物学（Nerve Cell Biology）、植物分子细胞生物学（Plant Molecular and Cell Biology）、逆境细胞生物学（Adverse Circumstance Cell Biology）和进化细胞生物学（Evolutionary Cell Biology）等。

1.1.2 细胞生物学在生命科学中的地位

由于细胞是生命的基本单位，对各种生命现象的探索都需要深入到细胞，因此细胞学、细胞生物学是生命科学中的重要分支学科，也是基础学科。诸如形态学、解剖学、分类学、组织学、胚胎学、生理学、遗传学等的发展，均离不开细胞研究的基础。从生命的结构层次看，细胞生物学位于分子生物学和个体生物学之间，与它们相互衔接、相互渗透，从这个意义上说，细胞生物学又是一门承上启下的学科。

由于细胞生物学研究的内容十分广博，涉及生命现象的各个方面，在其发展过程中细胞学已与许多分支学科有交叉、渗透，以至融合形成一些交叉学科，如细胞遗传学、细胞生理学、细胞病理学、细胞化学及生化细胞学、细胞生态学、细胞分类学等。

1.2 细胞生物学发展简史

研究一个领域的历史，是理解这个领域的概念的最好途径。

1.2.1 细胞的发现和细胞学说的建立

细胞的发现和显微镜的发明是分不开的。第一台复式显微镜一般认为是由荷兰的两位眼镜制造者詹森（Z. Janssen 和 H. Janssen）发明的。其后，英国人胡克（Robert Hooke）1665 年在他发表的《Micrographia》（《显微图谱》）中首次描写了细胞的存在。他用自制的显微镜观察软木薄切片，发现软木是由许多小室构成的，并将这些小室称为细胞（cell，原意小室），实际他所看到的是软木组织中死细胞的细胞壁。随后，学者们陆续在不同的生物体中重复看到了细胞、细胞核，并在原生动物中看到了细胞内容物。在 100 多年间早期显微镜工作者累积大量观察资料的基础上，终于由德国植物学家施莱登（M. J. Schleiden）和动物学家施旺（T. Schwann）最后作了结论，施莱登（1838）提出所有植物体都是由细胞组合而成，这一结果

被施旺(1839)在动物中证实。由此首次提出了"细胞学说"(cell theory),明确地指出,"细胞是有机体,整个动物、植物这些有机体都是细胞的集合物,它们按照一定的规律排列在动植物体内",即一切动物和植物体均由细胞组成。细胞学说为人们所公认,它很快被推广到单细胞生物,人们认识到原生动物是只具一个细胞的动物(Von Siebold, 1845);并先后证明精子和卵在组织学上也是一种细胞。魏尔啸(R. Virchow, 1858)把细胞学说应用到病理学,证明病理过程是在细胞和组织中进行的。细胞学说的建立不仅说明了生物界的统一性和共同起源,成为建立生物界进化发展学说的基础,而且也开辟了生物学研究的一个新时期,促使细胞学发展成为一门学科,并渗透到生物科学的其他分支学科,成为一些学科的基础。恩格斯在《自然辩证法》一书中把细胞的发现列为19世纪自然科学3大发现(能量转换的证明,达尔文的进化学说)之一。

从细胞学的诞生到细胞生物学,经历了显微、亚显微、分子水平3个发展时期(或阶段)。

1.2.2 细胞学发展的显微水平时期

细胞学说建立后,引起了人们对多种细胞进行观察研究的兴趣。首先将所发现的动、植物细胞的内容物称为原生质(protoplasm)(Pukinji, 1840; Von Mohl, 1846)。到1861年,M. Schultze总结过去研究累积的资料,确定动、植物细胞中的原生质本质上是相同的,认为动、植物有机体的组织单位是一小团原生质。有人(J. von Hanstein, 1880)又提出原生质体(protoplast)的概念,其后称之为原生质理论(O. Hertwig, 1892)。这一理论丰富了细胞的内容,认为细胞是一团生活物质或原生质,在空间上有一定界限,有一个核和一层细胞膜。有些有机体其细胞结构不很清楚,但还是由原生质组成,如粘菌。这些见解虽比原来意义的细胞(cell,小室)内涵更深,但由于cell一词简明,已被广泛接受,故一直沿用至今。

当时,细胞核在细胞分裂中的变化引起了研究者的注意,如发现了鸡胚血细胞的直接分裂(R. Remak, 1841),魏尔啸(1855)提出了"一切细胞来自细胞"的著名论断,在动物细胞(W. Flemming, 1879)和植物细胞(E. Strasburger, 1880)分别发现并描述了间接分裂,有人(Scheicher, 1878)称之为核分裂(karyokinesis)。Flemming(1882)又将直接分裂称为无丝分裂(amitosis),将间接分裂称为有丝分裂(mitosis),并证实有丝分裂实质是核内丝状物(染色体)的形成及其向两子细胞的平均分配。1888年W. Waldeyer将有丝分裂中出现的染色深的小体命名为染色体(chromosome)。接着又相继在动物(Van Beneden, 1883)和植物(E. Strasburger, 1886)发现了减数分裂(meiosis)。至此,已发现了细胞分裂的3种类型。

这时显微镜的分辨率已大为提高,并发明了石蜡切片法(Klebs, 1860)及一些重要染色方法,随之各种细胞器如中心体(Van Beneden, 1883; T. Boveri, 1888)、线粒体(R. Altmann, 1894; C. Benda, 1897)、高尔基器(C. Golgi, 1898)等被相继发现。

值得注意的是,细胞学的发展与对胚胎发育和遗传的研究密不可分。从细胞学说建立后,1841年Albert Kölliker首先将细胞学说应用到胚胎方面的研究,证实精子也是一种细胞,是由睾丸中的细胞转化的。继之又将这一概念推广到卵。其后又发现卵的受精作用是两个原核的融合(O. Hertwig, 1875),并发现配子细胞的染色体数为体细胞的一半(Van Beneden, 1883),而且认为所有有性生物中染色体数目一定作周期性减半(A. Weismann, 1887)。同时O. Hertwig和R. Hertwig(1887)用实验的方法研究海胆卵、蛔虫卵的受精作用,研究在外界条件影响下,刚受精的卵,雌雄原核能否合并,去掉细胞核的卵核能否继续发

育。也有不少学者(如 R. Hertwig, 1896; J. Loeb, 1899; T. H. Morgan, 1899, 1900)用物理、化学的方法刺激未受精卵也能使其发育(为人工孤雌生殖)。有学者认为这是实验细胞学的开始,它促进了细胞学的发展。

在细胞与遗传方面,魏斯曼(A. Weismann, 1883)提出生殖细胞连续性理论来解释遗传性状的传递。认为遗传性不是通过体细胞而是通过性腺中的细胞传递的。1892 年他出版《种质论》(Keimplasma Theorie)。认为种质世代相继连续不绝,所以也称种质连续学说。体质随个体的死亡而消失,种质存在于细胞核染色体,它包含无数小单位(如决定子),在胚胎中这些遗传小单位的不同分布导致并决定细胞的发育分化。这一学说对以后染色体遗传和基因学说的建立都有意义。遗传的基本规律是孟德尔(Gregor Mendel)在 1865 年发现的,当时对性细胞中细胞学变化不甚了解,无法解释遗传因子的分离和自由组合规律,孟德尔的工作被忽视了,直到 1900 年,才分别被 3 位从事植物杂交试验的工作者(H. de Vries, C. Correns, E. von Tschermak)所发现。那时细胞学已能解释孟德尔提出的遗传因子的分配机制。知道两性机体具有二倍的遗传成分,生殖细胞或配子中具有单倍的遗传成分。随后又发现了性染色体,提出性别决定与染色体有关(C. E. McClung, 1902),以后的研究(Stevens, Wilson, 1905)证实了这一点。美国的 W. S. Sutton 和德国的 T. Boveri,不约而同地于 1902 年提出遗传的染色体学说(chromosome theory of heredity),但是为染色体学说最后奠定实验基础的是摩尔根(T. H. Morgan)及其合作者,他们将基因(gene,遗传单位)落实到染色体上(Morgan, 1910, 1912…),1917 年摩尔根发表"基因论"(the theory of gene)论文,1926 年出版了名著《基因论》,它对遗传学、细胞学的发展产生了巨大的推动作用。提出基因在染色体上成线性排列,成为一个个连锁群。他从染色体和基因的角度科学地解释了遗传的 3 大定律(孟德尔的遗传因子分离律和自由组合律,以及摩尔根的基因连锁遗传规律)。细胞学与遗传学紧密结合,形成并发展了细胞遗传学。

由上述可见,从 19 世纪中期到 20 世纪 20 年代,细胞学的发展与遗传和发育的研究紧密结合。在细胞水平研究遗传和发育的基础上,胚胎学家、细胞学家 Edmund B. Wilson 出版了 3 版的巨著《发育和遗传中的细胞》(The Cell in Development and Heredity, 1896, 1900, 1925),对这一时期细胞学的发展作了全面细致的概括和总结,反映了当时细胞学发展的主流。1932 年英国细胞遗传学家 C. D. Darlington 出版了《细胞学的最新进展》(Recent Advances in Cytology),概括了 Wilson 巨著第 3 版以后细胞学研究的成就。

这一时期的细胞学工作处于显微水平,有人称之为古典细胞学时期,也有人将 19 世纪最后 25 年称为经典细胞学时期,而将 1887 年以后称为实验细胞学时期。也有将 20 世纪 40 年代以后称为实验细胞学时期。在 20 世纪 30 年代初就有《实验细胞学教科书》(A Text Book of Experimental Cytology, J. Gray, 1931)出版。而且直到现在,细胞生物学的研究也必须通过实验进行,因此实验细胞学如何划分,值得考虑。

1.2.3 细胞学发展的亚显微水平时期

从 20 世纪 30 年代开始,细胞学逐渐进入发展的新时期。细胞学的发展与电子显微镜的发明及其他物理学、化学技术的建立分不开。1931 年德国柏林大学的 M. Knoll 和 E. Ruska 研制出电子显微镜的雏型,1933 年末研制出可供使用的能放大 10 000 倍的电子显微镜,以后不断提高电镜的分辨率和改进超薄切片技术。从 20 世纪 40 年代以来,特别是 50

年代应用于对细胞结构的研究，大量的电镜工作揭示出惊人的细胞亚显微世界，发现了一些过去在光镜下看不见的细胞器及其结构，如内质网(Porter, Claude 等, 1945)、过氧物酶体(Johannes, Rhodin, 1954)、溶酶体(Novikoff, Beaufay, de Duve, 1956)、核蛋白体(Robertis, 1958)等；观察到各细胞器的精细结构，如叶绿体(Granick, Porter, 1947)、线粒体(Palade, 1952, 1953)、高尔基器(Dalton, Felix, 1953, 1954; Sjöstrand, Hanzon, 1954)等；解决了许多悬而未决或争议的问题，如质膜的存在与否、高尔基器的形态结构问题等，电镜工作作了肯定的回答。学者们广泛地对多种细胞进行电镜研究，累积了大量细胞亚显微结构的资料后，不少学者又侧重于对其功能进行研究。20 世纪 60 年代开始已能分离出具膜的细胞器，同时生化离心技术与电镜技术结合，对分离出的较纯净的细胞器进行化学组分分析。还用同位素标记电镜放射自显影术、电镜细胞化学、免疫组织化学等技术，对细胞的物质和能量代谢、蛋白质合成、分泌，以及一些酶的结构蛋白在细胞内的空间排布及其催化反应、细胞代谢的时空顺序性等种种复杂生命现象已有一定认识，但对细胞结构的许多功能尚属推测。

1959～1964 年 Jean Brachet 和 Alfred E. Mirsky 主编出版了 6 卷具有划时代意义的巨著《细胞：生物化学、生理学、形态学》(The Cell—Biochemistry, Physiology, Morphology)，全面、系统地概括了这一时期细胞学发展的主要成就和研究的诸方面。

对细胞的研究，从早期显微水平的形态描述，深入到电镜下亚显微水平结构的研究，进而结构与功能和生化生理相结合，对细胞结构和功能研究的层次越来越深入，细胞学的发展已超出原来的范围，向细胞生物学转变。

1.2.4 细胞生物学的形成和发展

从 20 世纪 60 年代起，细胞学发展成为细胞生物学。细胞生物学这一名词在 Wilson 的巨著第 1 版(1896)曾提出过。亚显微水平的细胞学为其形成创造了条件，但是现代意义的细胞生物学是随着分子生物学的发展而兴起的。1953 年 J. D. Watson 和 F. H. C. Crick 提出 DNA 双螺旋结构模型，是生物科学在分子水平上发展的一项重大突破，从此生物化学家和遗传学家开始探明基因的结构、表达和调控等细节，发展了分子生物学和分子遗传学。分子生物学和分子遗传学的成就和方法对细胞生物学的形成和发展起了极为重要的作用。在这方面最突出的成就之一，就是在微生物上发现了蛋白质合成的遗传信息传递途径——中心法则(central dogma)(Crick, 1957)，继之从 20 世纪 60 年代以来 DNA 遗传密码的破译，基因作用操纵子学说的提出以及 DNA 重组技术和淋巴细胞杂交瘤技术的发明和应用等，无一不渗透融合于对细胞的研究。再加上分子生物学又不断取得进展，一批重要的生物大分子、大分子复合物和超分子体系(如受体、离子通道、间隙连接等)的三维结构陆续得到解决，这些进展促进了对细胞在分子水平上的研究。

由于分子生物学、分子遗传学以及一些新的物理学、化学的技术方法不断地应用于细胞的研究，再结合细胞学方法定位研究的特点，不仅为细胞生物学的形成发展创造了条件，也极大地促进了细胞结构和功能深入到分子水平上的研究。从 20 世纪 60 年代以来，特别是 20 世纪 80 年代以后，细胞生物学在分子水平上逐渐地获得了全方位的进展：如细胞膜的结构与功能的研究在分子水平上的深化、已知细胞器新功能的发现、活细胞内蛋白质的折叠、蛋白质通过分选信号的分选和定向运输、细胞核染色质的 DNA 的复制与转录、表达调控、细胞骨架、细胞周期的调控等研究均在分子水平上取得了迅速进展。细胞通讯、信号传导通

路的发现,发展为更深层次的研究——信息相互交谈(cross talking)。细胞分化的研究已认识到分化需要多个基因以及一系列调控因子的作用。对高等动物发育的研究取得了惊人的进展,从卵子发生到形态发生等方面正在基因水平上进行全面分析。对细胞衰老、死亡等研究也都在基因水平上取得了很大进展。另一方面基因工程技术也不断发展,如基因分离、重组、转基因以及基因治疗等。通过研究,人们逐步认识到生理过程或病理过程不仅涉及单个基因,也涉及不同的基因网络。因此应从基因组整体进行研究,鉴于此,美国科学家首先倡议开展基因组计划的研究。

人类基因组计划(Human Genome Project, HGP)是从1989年开始组织,1990年正式实施,由国际人类基因组组织来统一协调计划。计划用15年左右时间耗资30亿美元,测定包含3×10^9bp(碱基对)的人类基因组(24条染色体:22条常染色体和X、Y染色体),绘制遗传连锁图、物理图、序列图和转录图,由世界各国科学家共同承担。因此它是当今一项跨世纪、跨国界的生命科学最大的科学工程,其意义堪与阿波罗登月计划及曼哈顿原子弹计划相媲美,它对人类的影响极为深远。该计划的实施,将对整个生命科学和人类健康产生巨大的变革和作用。人类基因组蕴涵着人类生老病死的绝大多数遗传信息,破译它将为疾病的诊断、新药物的研制和新疗法的探索带来一场革命。我国在上海、北京相继成立了两个人类基因组研究中心,已在人类疾病基因(如高血压、糖尿病及多种肿瘤病相关基因)和重要功能基因研究中获得进展,并于1999年9月参加了这一计划。1999年12月初英国的《Nature》杂志报道了完成人22号染色体DNA核苷酸序列测定的工作,这是世界首次提供的在一条完整染色体上的全部遗传信息;2000年6月27日科学家公布完成人类基因组结构草图;2001年2月12日美、英、日、法、德、中6国科学家和美国Celera测序公司联合公布人类基因组图谱及分析结果,分别发表在2月15、16日出版的国际著名杂志《Nature》和《Science》上。初步分析表明,人类基因组由31.647亿bp组成,共有3～4万个基因,远小于原先10万个基因的估计。对此人类基因组研究的突破性进展,全世界科学家为之振奋和鼓舞,轰动世界。

此外,水稻基因组计划也已获得突破性进展。对一些模型生物如酵母、线虫、果蝇等不同门类生物的基因组、调控基因群以及发育调控模式的比较研究,在基因和细胞水平探索遗传、发育和进化的关系。

人类基因组计划主要解决基因组结构问题,接着就是基因组功能的研究,研究的重心将逐步转移到对基因组功能信息的提取、鉴定和开发利用等方面。真核细胞基因组结构与功能调控研究是细胞研究的核心问题,它主要探索基因产物如何构建细胞结构以及如何行使和调节细胞功能。在细胞分子水平研究上,细胞生物学、分子生物学和分子遗传学已交织融合难以区分。

1998年开展的生物芯片(biochip)技术已在生命科学研究领域崭露头角。它是把半导体工业中微加工和微电子技术与有关的生物技术相结合,将生命科学研究中的许多不连续的分析,如样品制备、化学反应和分离检测等,缩微到半导体硅芯片中,从而具有高速度、分析自动化和高度并行处理能力。如高密度基因芯片上集成的成千上万密集排列的基因探针,能够在同一时间内分析大量的基因,准确高效地破译遗传信息;又如芯片毛细管电泳检测,在微型通道中完成毛细管电泳分子分离,分析速度可成千上万倍地提高,所需样品和化学药品的量可成百上千倍地减少。生物芯片实验室的出现,对分子生物学、细胞生物学、疾病诊断和治疗、新药开发、作物育种与改良、司法鉴定、食品卫生监督等领域的工作起推动作

用。

从教学用书的出版，也能反映细胞生物学发展的脉络。如 E. De Robertis 等 1946 年出版的《普通细胞学》(General Cytology)，直到 1960 年第 3 版仍称《普通细胞学》，到 1965 年版改为《细胞生物学》(Cell Biology)，到 1980 年版则改为《细胞与分子生物学》(Cell and Molecular Biology)。到 20 世纪 80 年代及其后出版的教学用书把细胞和分子融为一体，如《细胞分子生物学》(Molecular Biology of the Cell, Alberts, 等)和大量的《分子细胞生物学》(Molecular Cell Biology, 如 Lodish, 等; Avers; Darnell, 等)。这些著作也是这个学科发展的见证。

值此新千年新世纪伊始，回顾细胞生物学的成就，憧憬其发展，倍受鼓舞鞭策；崇敬前人贡献，激励今人奋进。

1.3 细胞生物学研究的实践意义

当今世界人类面临着人口爆炸、环境污染、粮食危机、资源匮乏的严重挑战，直接威胁着人类社会的可持续发展，生命科学的地位显得更加突出重要。作为生命科学支柱的细胞生物学，在研究生命奥秘的过程中，应用和发展了许多新的手段和思路，如基因重组技术的应用、转基因动植物的发展、人类基因组计划的实施、生物芯片的开发等。生物技术的研究、开发以及产业化方面发展迅速，有着难以估量的潜力，已为或将为医药、保健、农业、食品以及环境等问题的解决作出重要贡献。下面仅就医药和农业两方面的实践作些介绍。

1.3.1 医药方面

细胞是人体正常结构和功能的基本单位，也是疾病病理的基本单位。细胞生物学的基础研究对了解诸如细胞衰老、癌变、射线损伤以及激素作用、免疫和病毒感染机理均有重要意义。如对溶酶体的研究，了解到细胞的变性、坏死，特别是风湿性关节炎、痛风、矽肺等病的发病原因。现已研究发现有 40 种以上的疾病是由于溶酶体中缺乏某种酶而产生的。例如家族黑蒙性白痴病(Tay - Sachs 氏病)是由于溶酶体中缺乏氨基己糖酯酶(hexos - aminidase)所致。癌基因、抑癌基因的发现加深了对癌变本质的了解，实际上它们是与细胞周期调控和信号转导有关的基因，由于调控基因的突变和基因组完整性不可逆的破坏而导致细胞生长、衰老和凋亡调控的失衡，这为探索癌变机理、寻找抗癌药物提供了新的思路。

医学实践中应用细胞生物学技术对疾病的诊断、治疗和医用药物的生产等也有重要意义。如细胞培养技术对癌细胞和病毒的研究及疫苗生产均是不可缺少的手段，在生产上已应用了高密度的细胞培养技术；染色体技术早已用于遗传病及肿瘤诊断；细胞化学(包括免疫细胞化学)、荧光激活细胞分离、原位杂交等新技术为癌细胞及其他疾病的诊断提供了快速可靠的方法。特别是 20 世纪 70 年代发明的淋巴细胞杂交瘤技术为肿瘤诊断及各种病原微生物的检测提供了专一的单克隆抗体。单克隆抗体体外诊断已用于许多种危害人类健康的重大疾病。

近年来已开展应用基因操作技术对疾病进行基因治疗。即将外源基因通过载体导入体内(器官、组织、细胞内)表达，从而达到治疗的目的。自 1990 年临床上首次将腺苷酸脱氨酶(ADA)基因导入患者白细胞治疗遗传病——重度联合免疫缺损病以来，已在许多种病如白

血病、囊性纤维化(CF)肿瘤、艾滋病等方面进行临床试验,但成功者较少,其主要原因是需掌握好基因治疗的三大技术关键:①有效的治疗基因;②基因导入系统(安全、特异又高效表达的载体);③基因在人体内表达及其调控系统。解决好这几个问题,基因治疗将引起临床医学的巨大变革,将为目前无法治疗的大部分遗传病、一些重要病毒性传染病(如各型肝炎、艾滋病等)、恶性肿瘤、心脑血管疾病及老年病等开辟广阔前景。随着人类基因组计划的实施和完成,及"后基因组"时代的到来,将不断发现决定人类生命活动的重要功能基因和引起人类重要疾病的基因并阐明其功能,基因治疗有可能在21世纪20年代以前成为临床医学常规治疗的手段之一,基因诊断、基因疫苗也将在预防医学上发挥重大作用,使人类的健康质量大为提高。

另一项在医疗上令人注目的是组织工程(tissue engineering)技术的发展。它能人工地创造生物的活组织、器官,用以修复或置换人体已损坏或丧失功能的组织、器官。例如,将患者自身的(或他人的)细胞(如从组织分离的干细胞或胚胎干细胞收集起来,在实验室培养增殖后,放在用生物可降解聚合物(biodegradable polymers)做成的三维载体支架中,移植于人体创伤处,细胞在此分裂、分化,重组形成新组织,与此同时,人工聚合物降解了,只将完全自然的最终产品——新组织、器官留在人体;或者在体外培养完成后,再移入人体;或者用分离细胞或用特定分子(如生长因子)植入伤口或需要再生的器官中,这些细胞分裂增殖使组织再生;或用生长因子促进患者自身细胞移向受伤部位使组织恢复。如美国有些医院已将组织工程产品,如皮肤(包括真皮和表皮)、软骨、骨、韧带和腱等,用于临床治疗。对更复杂的器官,如肝、肾、乳房、膀胱和肠等,也正在研制或临床试验中。尽管利用细胞和合成聚合物建造新组织器官还困难重重,但总有一天研究人员会根据需求定做器官,人们不致因缺乏移植器官而死亡。

在药物方面,应用基因工程技术,在国际上研制、开发和产业化方面发展迅速。1998年报道已有上百种多肽和蛋白类药物、细胞因子、单克隆抗体、核苷酸类药物已进入临床试验,其中有40余种已成为商品投放市场,产品销售额成百上千亿美元。我国自1986年以来,用基因重组研究开发的多肽和蛋白质类药物约20余种。利用转基因操作技术,将某种有特定功能的目的基因转移到动、植物体内并使其在特定器官内高效表达,这样构建的转基因动、植物作为生产药物和具重要生物功能的活性物质,从20世纪80年代以来有很多研究,但是真正能高效表达而成为生产药物的"生物反应器"(如牛、羊的乳腺)或含有某种药物的转基因植物,仅有少数成功,尚待进入大规模开展的产业化阶段。我国已利用转基因山羊体细胞克隆出羔羊,还在国际上首次培育成功了一头携带有人血清蛋白基因的转基因试管牛。

此外,用转基因动物作为人类异体器官移植的供体也是一个颇具诱人前景的领域。目前人体器官移植的供体严重不足,致使一批批垂危病人失去生存机会。如选择一种动物(如猪)内脏大小和结构与人的接近,将抗人体排斥的基因转移到该动物体内并在器官组织中高效表达,这样育成的动物器官组织可作为供体移植而不产生排斥反应。例如在美国、英国已育出作供体器官移植的转基因猪。但这种抗人体排斥的功能需要稳定传代,且能大量繁殖后代,成为稳定的供体来源,尚需要一段时间。如果与"克隆羊"技术结合,有望能快速实现具有上述性状的转基因猪的批量生产。

1.3.2 农业方面

细胞生物学的理论与技术对农业的发展也有重要意义。在农作物方面，作物的生长发育、物质运输与分配、遗传变异、抗逆性、育种途径的探索等基本问题无一不与细胞生物学的基础研究有关。例如抗逆性，植物在逆境(高温、低温、干旱、碱、病原菌及环境污染等)中受到的损伤以及对恶劣环境的抗性和适应性，均可在细胞结构和功能中反映出来。

细胞生物学技术在作物方面的应用，如进行细胞培养、选择细胞突变体、原生质体培养和细胞杂交、花粉培养、细胞转化等。特别是花粉培养单倍体育种，可迅速克服杂种分离，大大缩短育种年限，并提高选择效率和准确性。应用花粉培养、染色体工程等育种技术已育出水稻、小麦、油菜、甘蔗、香蕉等一批作物新品种或品系已在生产上推广。

基因工程应用于植物，自 20 世纪 80 年代以来主要在作物和蔬菜等转基因抗虫、抗病、抗旱、抗盐等方面的研究。到 1997 年底，转基因作物商品化种植面积全球已达 1280 万公顷，是 1996 年的 4.5 倍。美国的转基因玉米种植面积已达 30%。在我国，1999 年有 30 万公顷农田种植了转基因作物，主要是棉花，比 1998 年增长了 2.04 倍。中国为第四大转基因作物种植国。抗棉铃虫转基因棉花的抗虫率高达 80% 以上，抗烟草花叶病毒的转基因烟草、转基因抗虫玉米、延熟保鲜番茄等也已用于生产。我国把萤火虫发光基因转到烟草中获得了发光烟草植株，由此有人想培育能发光的行道树。

在畜牧方面，继 1982 年转基因“巨鼠”出现之后，启发人们纷纷开展转基因家畜的研究。在国内外转基因猪、牛、羊已不罕见。在我国转基因瘦型猪、高产奶的奶羊以及能从奶中提取药物的转基因羊、转基因鱼等也逐渐进入实用阶段。

在基因重组技术推动下，农药、兽药以及动、植物生长调节物等生物制剂也进入了一个新的阶段。出于保护环境的需要，现在以微生物重组技术构建的工程菌为生物农药广泛应用开辟了新途径。基因工程与发酵工程结合，大规模的生物制品也已有新发展。人类对动、植物生长发育的调控能力大为提高。

1996 年 7 月历史上第一只“克隆羊”多莉(Dolly)在苏格兰诞生。6 个月后(成为性成熟的羊)报道，成为世界上最受注目的羊，轰动了科学界。因为作者是用成年绵羊的乳腺上皮细胞(体细胞)经核移植获得的。这说明成年哺乳动物已分化的上皮细胞仍具“全能性”。继克隆羊之后，克隆鼠、克隆牛、克隆猪等克隆动物在世界各地相继问世。随之而来的是有人提出“克隆人”的问题，但遭到各国政府的禁止或暂时禁止，至于以治疗为目的人体器官克隆，人们给予了极大的关注。据有关报道，克隆技术对帕金森氏症、糖尿病、肝炎、动脉硬化和肺癌等疾病，可以对损坏的细胞和组织进行置换和修补。尽管在克隆人和克隆人体器官在道义上有差异，但在技术上是一致的，如何存其利弃其弊，使克隆技术造福人类而不致走向反面，依然留待人们去思考。

内容提要

细胞生物学研究的对象是细胞。细胞是生物结构与功能的基本单位。细胞生物学是研究细胞的结构、功能以阐明生命活动基本规律的学科，它是从细胞的显微、亚显微和分子水平 3 个层次及细胞间的相互关系来揭示生命活动的基本规律，如增殖和生长、发育和分化、

遗传和变异、兴奋传导和运动、细胞通讯、细胞识别和免疫、细胞的衰老和死亡以及细胞起源和演化等。

细胞生物学是生命科学中重要分支学科之一，是基础学科，它与许多学科交叉、渗透以至融合形成若干交叉学科。

细胞生物学的发展历史，自细胞的发现和细胞学说的建立，至细胞学的诞生到细胞生物学的形成和发展；经历了显微、亚显微、分子水平3个发展时期。细胞学主要从细胞的显微和亚显微两个结构层次进行研究。细胞生物学是细胞学发展的新阶段，它的标志性特征是深入到分子水平，从细胞的3个结构层次（显微、亚显微和分子水平）研究生命活动的基本规律。

细胞生物学的形成和发展与仪器、技术的发明和改进密不可分，同时也与其他有关学科的相互交叉、渗透、融合密切相关。

细胞生物学的研究不仅是认识生命活动规律的理论基础，而且它的理论和技术对医学、医药和农业等方面都有重要的实践意义。

思 考 题

1. 细胞生物学的研究对象和基本内容是什么？细胞生物学和细胞学在研究内容的层次上有何不同？根据细胞生物学的研究内容，你认为细胞生物学在生命科学中所处的地位如何？
2. 你如何理解细胞生物学从细胞3个结构层次上研究生命活动的基本规律？
3. 了解细胞生物学历史发展的3个时期（或阶段）的主要特征。
4. 通过细胞生物学发展史的学习，了解科学发展与继承的关系，了解科学发展与技术发展的关系。
5. 了解细胞生物学的发展历史有何意义？对你有什么启示？
6. 研究细胞生物学有何重要的实践意义？

参 考 资 料

1. 汪堃仁，薛绍白，柳惠图主编. 细胞生物学. 第2版. 北京：北京师范大学出版社，1998. 1～14
2. 翟中和，王喜忠，丁明孝主编. 细胞生物学. 北京：高等教育出版社，2000. 1～16
3. 郑国锠. 细胞生物学. 第2版. 北京：高等教育出版社，1992. 1～7
4. 国家自然科学基金委员会. 细胞生物学. 北京：科学出版社，1997
5. 翁延年，张树庸. 回顾与展望——国内外生物技术发展情况简介. 周光召主编. 科技进步与学科发展. 北京：中国科学技术出版社，1998. 1001～1005
6. 贺林主编. 解码生命——人类基因组计划和后基因组计划. 北京：科学出版社，2000. 3～181，185～351
7. Wilson E B. The Cell in Development and Heredity. 3rd ed. New York: The Macmillan Co, 1925
8. Brachet J, Mirsky A F. The Cell—Biochemistry, Physiology, Morphology. Vol. Ⅰ～Ⅵ. New York & London: Academic Press. 1959～1964
9. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. Molecular Cell Biology. 2nd ed. New York: Scientific American Books Inc, 1990. 1～15
10. Alberts B, Bray D, Johnson A, *et al*. Essential Cell Biology. New York & London: Garland Publishing Inc, 1998. v～vii
11. Gerald Karp. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1999. 1～30

第2章

细胞生物学的研究方法

科学的发展离不开技术的进步，细胞生物学的发展也不例外。从细胞生物学的研究内容看：从细胞的显微、亚显微和分子3个结构层次上研究细胞。在显微水平上研究细胞的形态结构需用显微镜技术，现已发展出许多显微镜技术；从亚显微水平研究细胞需用多种电子显微镜技术；在分子水平上研究细胞的分子组成、结构和功能需用多种现代分子生物学技术及其他现代物理、化学新技术。这3个层次的研究绝不是孤立的。由于细胞作为整体是生命活动的基本单位，因此，要探索生命活动的某个规律，常需要这3方面技术以至更多技术的结合。如果脱离开细胞整体及其亚显微结构，仅单纯从分子水平研究，常无法解释复杂的生命现象。

鉴于细胞生物学学科的特点，学习细胞生物学需要对细胞生物学研究的技术方法有一些了解，因此本章仅就显微镜技术、电子显微镜技术以及一些常用的现代分子生物学技术加以介绍，并扼要说明这些技术最基本的原理和应用范围。

2.1 光学显微镜技术

一个典型的动物细胞，直径为10～20 μm，比人眼能看到的最小颗粒还小若干倍。自1665年Hooke用自制的显微镜发现细胞以来，经历了3个多世纪，人们不断地改进、创新提高显微镜的分辨率和反差，拓展显微镜的性能。迄今已发展有多种类型显微镜用于细胞的研究。可以说普通光学显微镜至今仍然是细胞生物学工作者的重要工具之一。

2.1.1 普通复式光学显微镜术

光学显微镜主要包括：①光学放大系统——目镜和物镜(为二组透镜)；②照明系统——光源、折光镜和聚光器(图2－1A)；此外还有机械支架系统。显微镜的有效放大倍数为几十倍到一千倍，但对任何显微镜来说最重要的不是放大倍数，而是它的分辨率。分辨率是指能分辨出的相邻两个质点间的最小距离。光学显微镜的最小分辨距离是0.2 μm。

在一般光学显微镜(光镜)下，几乎看不清细胞的结构。为了看清细胞的结构，已有许多方法制备光镜样品(如涂片、滴片、压片和切片等)。首先将细胞样品固定(如以甲醇、乙酸等

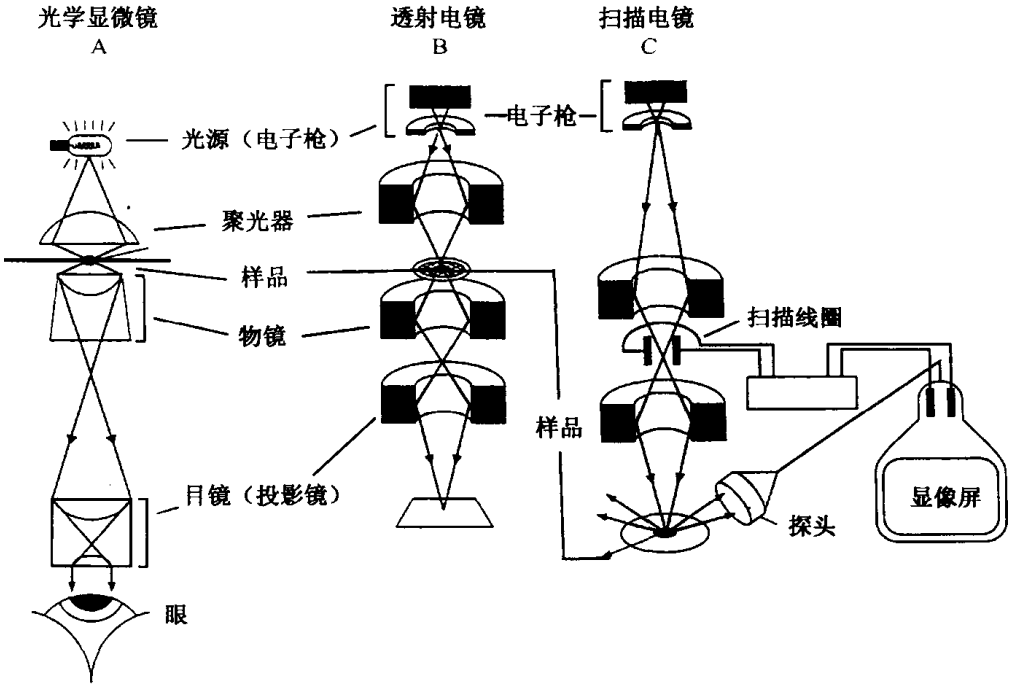


图 2－1　光学显微镜和电子显微镜的光路示意图

光镜和电镜的构造和原理完全不同，但其光路图十分相似。电镜主要包括：①电子束照明系统——电子枪、聚光器，由高频电流加热钨丝发出电子，经高电压使电子加速，经聚光器汇聚成电子束；②成像系统——物镜、投影镜等。它们是中空的圆柱体，内装线圈。通过改变线圈电流，调节圆柱体空间的磁场强度。电子束经过磁场发生螺旋式运动，最后聚焦成像，通过显像屏显示（电子枪、镜筒及记录系统均由两极真空泵不断抽气保持高真空）

固定剂），然后根据需要进行染色。由于不同染料对细胞组分有特异的吸附作用，如伊红、美蓝等特异地与胞质中的蛋白结合，甲绿、地衣红等能特异地显示 DNA 成分，这样就可以增强反差，便于观察其结构。

近年来采用了比有机染料更特异的染色技术，例如酶的细胞化学和免疫化学等。

2.1.2　相差显微镜术和微分干涉显微镜术

相差显微镜术（phase contrast microscopy）可以对活细胞进行观察。直接从显微镜中观察未经固定和染色的活细胞，这就要求设计出特殊的光学显微镜。相差显微镜与普通显微镜的不同点在于：它具有环形光阑的聚光器、带有相板的相差物镜。当光线经过相差聚光器、样品、相差物镜，将光束分为两部分，一部分是样品结构的折射光，另一部分为不受样品影响的光，经过相板，二者干涉，形成干涉图像。由于两束光的相位接近 λ/2（半波长），相差显微镜可使光的相位变化转变为振幅变化，这样就可见到反差分明的图像（图 2－2B）。适于观察较透明的或染色反差小的细胞组织。

微分干涉显微镜术（differential interference microscopy，DIC）是用平面偏振光，这些光经棱镜折射后分成两束，于不同时间经过样品的相邻部位，此后又经另一棱镜将此两束光汇合。由此样品厚度的微小区别就成为明暗差异，增强了样品反差并具立体感，适于研究活细胞中较大的颗粒或细胞器（图 2－2C）。

此外，暗视野显微镜术(dark field microscopy)是另一种观察活细胞的方法。暗视野显微镜与普通光镜的主要不同点是聚光器不同。照明的光线不直接进入物镜，因此视野是黑暗的。通过样品本身的光反射和折射的光进入物镜形成亮的像。这样就观察到暗背景中发亮的细胞结构(图 2－2D)。

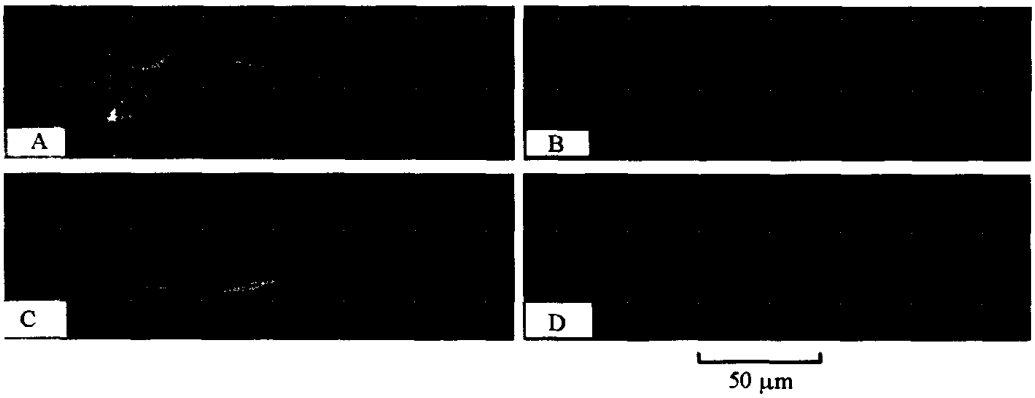


图 2－2 4 种不同的光镜技术观察的培养的成纤维细胞照片

A. 光直接通过细胞所呈的影像；B. 相差显微术影像；C. 微分干涉显微镜术影像；D. 暗视野显微镜术(引自 B. Alberts, 等)

2.1.3 荧光显微镜术

用荧光显微镜(fluorescence microscopy)可观察细胞中的荧光。当用激发光照射时，细胞发射荧光。这种荧光是细胞中固有的荧光物质[如还原辅酶Ⅰ(NADH)]发出的，这种荧光称为原发荧光。另一种是用荧光染料对细胞中的成分进行特异染色，再经激发光照射，例如，用荧光染料 Fluo－3 作为钙离子探针，可用来研究细胞中的自由钙离子的浓度。照射后经化学反应使组织中非荧光物质转变为荧光物质所发的荧光称为诱发荧光。其他还有免疫荧光等。细胞荧光显微技术在现代生物学中已被广泛应用于对特异蛋白质、核酸等生物大分子的定性、定位工作。

2.1.4 视频反差增强显微镜术

由于活细胞中的各种结构反差很小，所以很难用光镜观察到活细胞中的细微结构如单根的微管等。但通过电子仪器可使摄像机获取的模拟影像，以视频速度进行影像反差增强处理，并以视频速度显示出来，这样的视频反差增强显微镜术(video enhanced contrast microscopy, VEC)就可观察到活细胞内单根微管的动态变化(图 2－3)。

图 2－3 用视频反差增强显微镜观察细胞内微管纤维(箭头所示)(引自 J. L. Traris, 等)

应用细胞数字图像处理技术，在研究活细胞的分子动态变化过程中，需要长时间观察掺入到活细胞中的荧光探针的图像变化，如荧光标记的管蛋白如何组装到微管或从微管中释放出来(去

组装);钙离子荧光探针反映出活细胞内钙离子浓度和分布的变化。为避免荧光显微镜的激发光长期照射活细胞所引起的光损伤,要用极弱的激发光照明,因而发射的荧光极弱,只有用高灵敏的摄像机如冷却型电荷偶联器件(CCD)摄像机才能获得人眼看不见的影像。影像通过数字化处理后可用图像处理和分析程序在计算机上进行处理(如反差增强、平均、边缘增强等)和分析(测量细胞面积、周长、灰度值等),从而改善图像质量并从影像中获得大量的定量信息。

2.1.5 激光扫描共焦显微镜术

光镜的物镜不仅能收集物镜焦面上的影像,而且还能收集焦面上下一定范围内的影像(离焦)。为了获得细胞的三维影像,必须获取细胞不同的光切面的影像进行计算机图像三维重建。激光扫描共焦显微镜术(laser scanning confocal microscopy, LSCM)是用激光作为荧光的激发光,通过扫描装置对样品进行扫描就可获得二维荧光影像。在物镜后焦面处安装一个光阑(小孔),阻挡离焦的影像而只让焦面的像通过,到达光电检测器,就可获得焦面的影像,得到光切片的效果(图 2-4)。上下调节物镜就可获得细胞不同切面的图像,通过三维重建计算机软件就可获得细胞的三维图像。

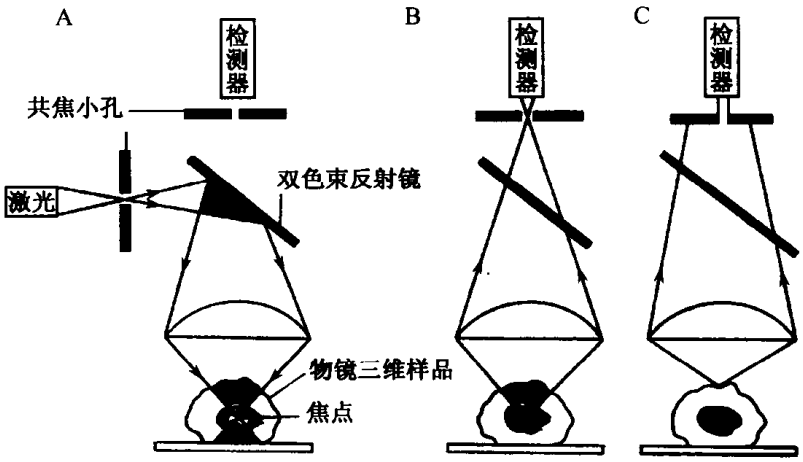


图 2-4 激光扫描共焦显微镜的原理图

A. 用通过小孔的聚焦光照射发荧光的样品; B. 从焦点发射的荧光聚焦在小孔到达检测器; C. 从离焦点发射的光在小孔处散焦,因而不被检测器检出

2.1.6 定量细胞化学技术

定量细胞化学(quantitative cytochemistry)是一种对细胞或组织中的化学成分进行定量分析的技术。常用技术有:显微分光光度术和流式细胞术等。显微分光光度术(microspectrophotometry),是根据细胞内某些物质能吸收特异光谱的原理来直接测量这些物质(如核酸)在每个细胞内的含量,如 DNA 对紫外线最高吸收波长为 260 nm,由此测出细胞中核酸(包括 DNA 和 RNA)含量。但大多数情况是用经过细胞化学染色的细胞或组织进行测量的,利用细胞化学产生的颜色对光的吸收,或测定荧光发射强度(用荧光染料染色时),可推算出细胞成分的相对含量。用流式细胞术(flow cytometry, FCM)和细胞图像分析技术也可达同样目的。

2.2 电子显微镜技术

2.2.1 透射电子显微镜术及超薄切片技术

光学显微镜的分辨率归根结底是受照明光线波长的限制。如前所述,光镜的极限分辨率为 0.2 μm,要提高分辨率,就要选择波长更短的光源,紫外光波长短可提高分辨率一倍,而电子束在不同的电压下有不同的波长,目前电镜已可分辨 0.1～0.2 nm。

一般所说的电子显微镜是指透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)(透射电镜),它的几何光学原理与光学显微镜大致相当(图 2－1B、C)。电子不能穿透玻璃透镜,但它带有负电性,因此可以通过磁场作用使之偏转、会聚和成像。在电镜中用于产生磁场的精密线圈称为电磁透镜。电镜的镜筒通常约 2 m 高,上端装有产生电子的电子枪。从钨丝做成的负极发出的热电子在环状正极的吸引下被加速,沿着镜筒冲下,经过聚光器聚焦,照射到样品上。透过样品的电子经过物镜、中间镜和投影镜依次放大,最后形成终末像。由于样品各处的密度不同,密度大的地方有更多的电子被散射,不能进入下方成像,因此在像的对应点上形成暗处。这种电子像是人眼看不见的,需将它投射到一个涂有荧光物质的屏上以便观察,或是投到底片上,使底片感光。由于电子很容易被空气分子所散射,所以整个镜筒都是抽成高真空的。

电子显微镜技术在细胞生物学研究中能发挥巨大作用,除了由于电镜本身的分辨率与性能不断提高外,生物样品制备技术的不断提高与改进,也是一个不可忽视的主要因素。用于电镜观察的生物样品一般要求很高:①样品很薄,最常用的是 50 nm 左右的切片;②经过固定(戊二醛和锇酸)、包埋(环氧树脂)、切片(玻璃刀或钻石刀)、染色(醋酸双氧铀和柠檬酸铅)等步骤后要求很好地保持样品的精细结构并在真空中承受电子束的轰击而不失真;③样品内必须有合适的密度差别以得到最大的物像反差。

此外,还有多种其他电镜技术如:负染法(negative staining)、冰冻断裂蚀刻复型(freeze fracture-etching replicas)技术,用于观察细胞内部结构的立体图像等,在此不一一赘述,如有需要可参考有关专著。

2.2.2 扫描电子显微镜术

扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)(扫描电镜)的"光源"部分与透射电镜相同(图 2－1C)。由电子枪发出的电子束经电磁透镜被汇聚成极细的"电子探针",由一组扫描发生器(偏转线圈)控制,在样品表面进行栅状扫描,即像读书一样,一行一行地逐点扫描。样品在电子轰击下产生二次电子。二次电子发放越多的地方,在像上相应的点就越亮。由于二次电子产生的多少与电子束入射角度有关,也即与样品表面的立体形貌有关,所以我们在荧光屏上得到一幅立体的图像。与此同时,在观察用的荧光屏上,另一个电子也做同步的扫描。为了防止样品脱水干燥过程中表面张力造成的变形,最常使用的是临界点干燥法(critical point drying, CPD)。为了改善二次电子发放的性质及防止电荷积累,通常还要在样品上蒸镀一层金膜。

现代扫描电镜的分辨率大多在 6 nm 左右,并且有很长的景深,所以特别适用于观察细

胞或细胞群体复杂精细的立体形貌。

用各种断裂法或离子剥蚀技术制成细胞断面时，也可用以显示细胞内部结构。如用未聚合的树脂或其他溶剂包埋后在低温下断裂样品，再脱去包埋剂，可在扫描电镜下得到各类细胞器及其相互联系的具有高度真实感的立体图像(图 2－5)。当样品受到电子束轰击时，除二次电子外，还会产生背散射电子、俄歇电子等条件信号。收集这些信号，可同时获得与原子序数即元素种类有关的图像。特别是利用不同原子在电子轰击下发射特定波长的 X 射线的性质，可以对微小区域的元素组成进行分析，称为“X 射线微区分析法”，其敏感度可达 $10^{-12}\sim10^{-10}$ g，并且不受该元素以何种化学形态存在的限制。

图 2－5 蛙内耳毛细胞扫描电镜投影图(引自 B. Alberts, 等)

2.2.3 扫描隧道显微镜术

扫描隧道显微镜(scanning tunneling microscope, STM)是一种探测微观世界物质表面形貌的仪器。STM 主要工作原理是利用量子力学中的隧道效应，当原子尺度的针尖在压电陶瓷的驱动下沿不到 1 nm 的高度上扫描样品的表面时，针尖与样品间产生隧道效应，从而获得样品表面的高分辨甚至是原子分辨的图像。

STM 的主要特点：①具有原子尺度的高分辨本领(侧分辨率为 0.1～0.2 nm，纵分辨率可达 0.001 nm)；②可以在真空、大气、液体等多种条件下工作，这在生物学领域的研究中尤为重要；③非破坏性测量。因为扫描时不接触样品，又无高能电子束轰击，原则上讲可避免样品的形变。STM 作为一种新技术，已广泛应用于生命科学研究领域。人们已用 STM 直接观察到 DNA、RNA 和蛋白质等生物大分子及生物膜、细菌细胞壁、病毒等的结构。可以预期，STM 将在纳米生物学研究领域发挥重要作用。

近年发展的扫描式透射电子显微镜(scanning transmission electron microscope, STEM)，使用高亮度的冷电子光源，汇聚成极细的电子探针后对样品进行扫描，然后收集穿过样品的电子，同时在样品下方装有电子能量分析器，所以这种电镜不仅能观察较厚的、不经染色的生物样品，并可以分析各部分的元素组成。用这种电镜已观察到汞标记的单个基因。但这种电镜要求极高的真空度，并在电子技术方面十分复杂，因此尚难普及。此外，还有高压电镜、超高压电镜和低温电镜等，在此不一一介绍。

2.3 细胞培养

细胞培养(cell culture)是指细胞的体外培养，包括单细胞的培养。这是在无菌的条件下，把动物或植物的细胞从有机体分离出来，在模拟体内的环境中，给以营养物质，使细胞不断生长、繁殖或传代，借以观察细胞的生长、分裂以及细胞的衰老、死亡等生命现象。

细胞培养的突出优越性是细胞可以脱离复杂的多细胞有机体的多种影响，在体外特定条件下加以培养，并用来直接观察生活细胞的形态及生长活动，从而了解各类细胞一定生理状态下所需的各种条件及其反应。因此，培养细胞可为医学、生物学研究提供极好的实验材

料。由于细胞培养技术可以与电镜、同位素标记、免疫荧光、各类电泳、细胞融合、DNA 转染、显微操作和显微录像等各种新型技术相结合，使细胞培养技术渗透到生命科学的许多领域中，并且取得了重要的成就。可以毫不夸张地说，近来细胞生物学一系列重要的理论研究进展，如细胞全能性揭示、细胞周期及其调控、癌变机理等的研究、细胞融合(cell fusion)以及细胞工程技术的建立都是与细胞培养技术分不开的。因此，可以说细胞培养不仅是一种技术，也是一门学科。

如果使一种类型细胞与另一种类型细胞融合，则可以形成一个含有遗传学上不同的分离开的核但有一个共同细胞质的细胞，这种细胞称为异核体。异核体提供了一种使 2 个分离细胞的成分如质膜、胞质和细胞核相互混合的条件，以便研究这些成分间的相互作用。例如，鸡红细胞与生长的组织培养细胞融合后，可使暴露在培养细胞胞质中的鸡红细胞的惰性核重新合成 RNA，最终导致 DNA 合成。

如果异核体进行有丝分裂，则可产生杂种细胞(hybrid cell)，用克隆方法，可从杂种细胞产生杂种细胞系，由于杂种细胞系不稳定而丢失染色体，所以对于研究人染色体上的基因定位极为有用。

2.4 细胞及其组分的分离和纯化

显微镜可以确定细胞器和大分子聚合物在细胞中的排布，甚至用特殊的染色方法可以确定特殊分子在细胞中的位置。但要对细胞内分子进行深入的了解，必须对细胞中各个组分进行生化分析。这种分析要求完全破坏细胞，导致细胞组分的解剖位置完全丧失。为了在分析时尽可能地保持分子原来位置的信息，已发展了一种可控制的破坏组织和细胞的技术，即在进行生化分析以前，把不同类型的细胞或细胞组分分离和纯化出来。

2.4.1 从组织中分离出不同类型的细胞

许多类型的分化细胞不能从培养细胞系得到。不过，直接从动、植物组织中分离出大量细胞进行生化分析是一种廉价快速的方法。其缺点是，高等动、植物组织中含有不同类型的细胞，所以在进行生化分析之前，必须使它们分离纯化，以便得到单一类型的细胞。要从组织中获得单细胞悬液，首先要破坏细胞外基质及细胞连接。从胚胎或新生动物的组织中可以得到大量分散得很好的活细胞。其方法是，用蛋白水解酶(胰蛋白酶和胶原酶)和钙螯合剂[乙二胺四乙酸(EDTA)]处理组织，再经轻度机械破坏，使之成为单细胞。

可以用几种不同的方法从混合的细胞群体中分离出不同类型的细胞。根据细胞的不同物理性质，通过沉降和离心，可使大细胞与小细胞，重细胞与轻细胞分开。还可利用一些细胞具有较强的与玻璃或塑料的粘附能力，使它们与其他细胞分开。其他还有，利用抗体特异性结合的特性使细胞分离技术有了重大改进。最高级的细胞分离技术是先用荧光染料偶联的抗体标记细胞，再用流式细胞仪来分选出标记或未标记的细胞。尽管细胞分离的技术多种多样，发展很快，但离心分离技术仍是目前细胞分离最常用的基本手段。

2.4.2 用超速离心机分离细胞器和大分子

得到纯化的细胞群体后，可用各种方法使细胞崩解。如低渗、超声粉碎、强制过滤或研

磨。这些方法可使细胞的许多膜结构(如质膜、内质网膜、高尔基器膜等)破坏成片段,膜片段立即再封闭成小的封闭泡。如果小心地使用这些方法,可以获得完整的核、线粒体、溶酶体和过氧物酶体。细胞群体降解成的可溶性提取物,是包含各种不同大小、电荷和不同密度的膜包围颗粒的浓悬浮液。小心地选择匀浆液,就可使各种颗粒保特完整细胞中细胞器的生化性质。

用超速离心机可从组织匀浆的混合物中分离出细胞的各种组分 (图 2－6)。在低速离

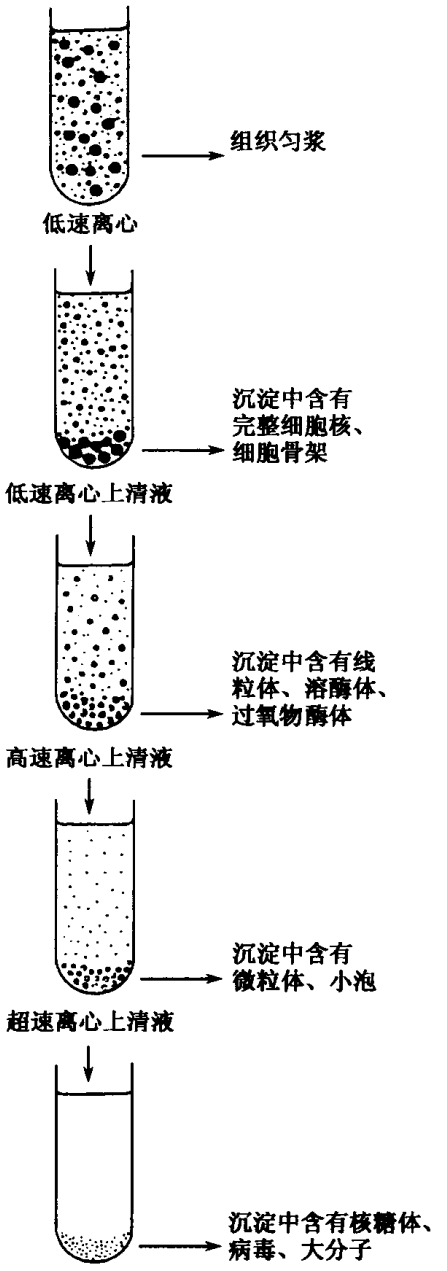


图 2－6　超速离心法

图示如何用递增的速度反复离心、分离纯化细胞提取液。较小的细胞组分一般要求更大的离心力才能沉淀

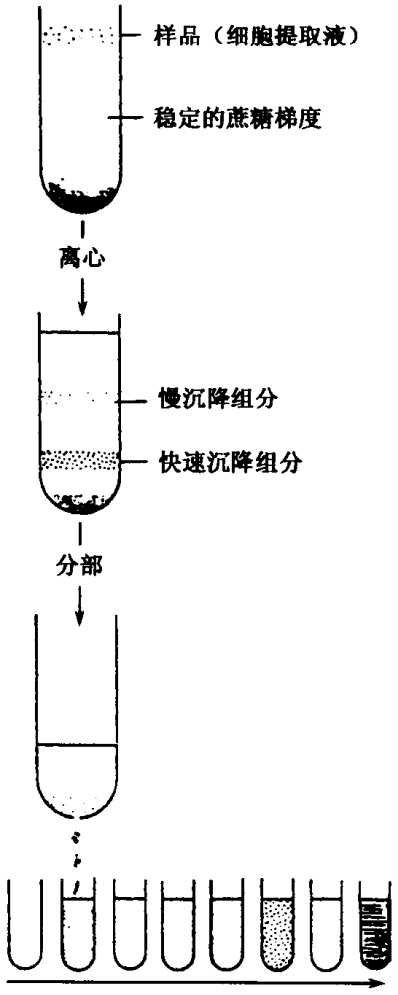


图 2－7　密度梯度离心法

离心管中的蔗糖溶液形成连续梯度,越靠近管底浓度越高(典型数值是 5%～20%蔗糖浓度)。离心后,分别收集不同组分,最简单的方法是在离心管底穿孔,以便从管底收集液滴

心时,大的组分如核和未破坏的细胞很快地沉降,在离心管底部形成沉淀;在较高速度时,线粒体沉淀;长时间更高速离心,使小的封闭泡沉淀;再提高离心速度就可使核糖体分离出来。所得到的分离组分是不纯的,对不同沉淀物进行反复离心,则可去除杂质。

为了达到精细的分离,可采用密度梯度离心法,在离心管的盐溶液中含有逐渐增加密度的高溶解性的惰性物质(如蔗糖),使溶液形成密度梯度。然后在该溶液上小心铺放一薄层细胞匀浆。在这种条件下进行离心,细胞匀浆中的不同分离组分以不同的沉降率沉降,形成不同的沉降带,因而可对不同的带分别收集(图 2-7)。不同组分的沉降率依赖于它们的形状和大小,通常以沉降系数或 S 值表示(表 2-1)。

表 2-1 一些典型的沉降系数

分子或颗粒	沉降系数	分子或颗粒	沉降系数
溶酶体	9 400 S	rRNA	28 S
烟草花叶病毒	198 S	tRNA	4 S
核糖体	80 S	血红蛋白	4.5 S

2.5 放射自显影技术

分子的任何性质,包括物理学、化学和生物学性质,原则上都可用各种方法检测出来。在细胞生物学的研究中,对分子的检测,可利用分子的光学性质,或用染料染色配合确定是否是纯物质,也可利用生物化学活性来测定。本节主要介绍一种最常用的利用放射性同位素示踪细胞分子的检测方法——放射自显影技术。

放射自显影技术(autoradiography)是细胞生物学中较有用的技术之一。它可确定放射性化合物在细胞和组织中的部位。首先用放射性化合物脉冲标记活细胞,在不同的时间取样,固定细胞和组织,把细胞或组织切片置于载玻片上,在暗处把感光乳胶或感光薄膜覆盖在细胞和组织上,并在暗处保持一段时间。在这段时间内,由于放射性同位素衰变使感光胶片曝光,再进行显影、定影处理。通过银粒的部位,可检测出放射性化合物在细胞和组织中的分布。例如 DNA 前体^{3}H-胸苷(^{3}H-TdR)在细胞核中,因为在核中合成 DNA(图 2-8)。RNA 的前体^{3}H-尿苷,开始积集在细胞核中,然后很快积累在细胞质中。放射自显影技术也可用于亚显微结构的分子水平。

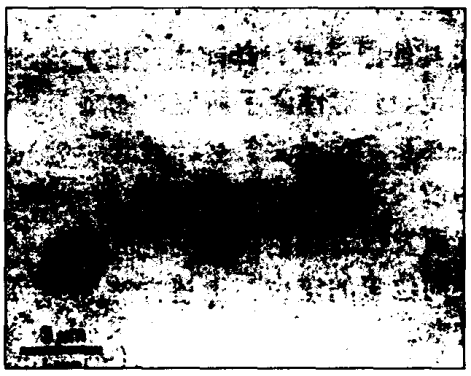


图 2-8 显微放射自显影图

用^{3}H-TdR 标记 3T3 细胞 20 min,洗去放射性同位素,涂布核乳胶,在暗处曝光,经显影、定影后观察,掺入^{3}H-TdR 的细胞(正在进行 DNA 合成的细胞)的核中有黑色银粒。细胞经吉姆萨染色(引自 M. Albert)

最近发展了磷屏成像系统可使放射自显影的速度提高上百倍。

2.6 单克隆抗体

1976 年建立了一种新技术，解决了抗血清的异质性问题。这就对细胞生物学中的抗体研究手段进行了彻底的改革。这种技术是通过克隆单个分泌抗体的 B 淋巴细胞，使之分泌大量的均一的抗体。由于在正常培养条件下，B 淋巴细胞的寿命有限，使免疫动物中的每个产生抗体的 B 淋巴细胞与具有无限繁殖能力的 B 淋巴瘤细胞进行融合产生杂种细胞，再从各种各样的杂种细胞混合物中，筛选出既能产生特殊的抗体，又能在组织培养条件下进行无限繁殖的杂种细胞。这种杂种细胞称为杂交瘤(hybridoma)。对每种克隆的杂交瘤传代培养，就能长久地得到单一的单克隆抗体(图 2－9)。

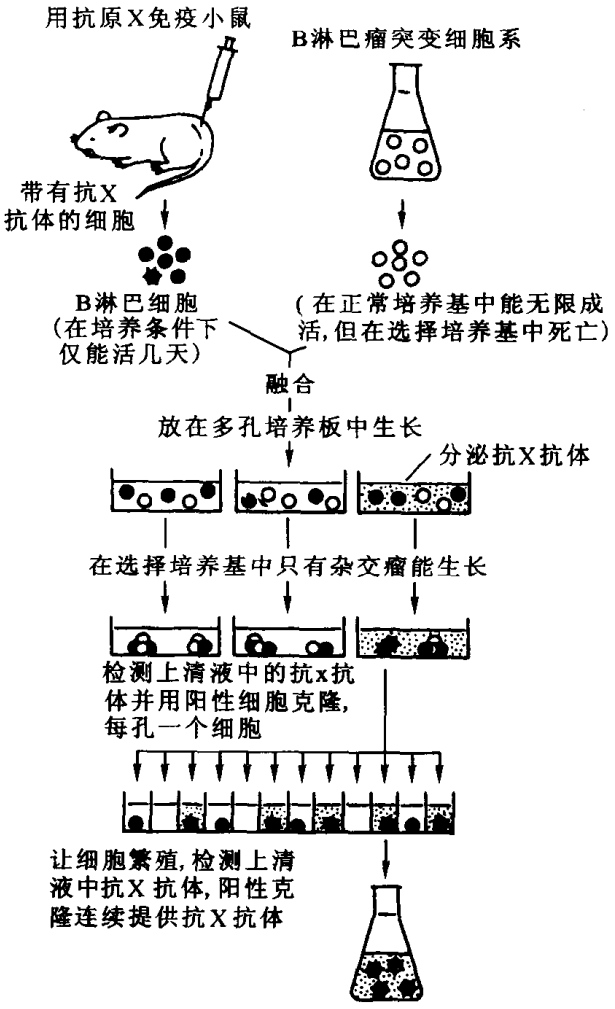


图 2－9 制备分泌抗 X 单克隆抗体的杂种细胞或杂交瘤示意图

选择性培养基中含有抑制剂(氨基喋呤)，它可阻断合成核苷酸的正常通路。因此细胞必须用旁路合成自身的核酸，在 B 淋巴瘤突变细胞系细胞中缺少这个旁路。由于用于融合的两种细胞都不能在选择培养基中长期生长，因而仅有杂种细胞能成活

因为单克隆抗体是单一的 B 淋巴细胞的产物，所以单克隆抗体是由一群同样的抗体分子组成，每个抗体分子带有相同的抗原结合部位。单克隆抗体可以识别分子的特殊部位，例如可识别一个蛋白侧链上 5 或 6 个氨基酸基团的构象，或多糖分子中 5 或 6 个糖残基。正因为单克隆抗体的专一特异性，它比一般抗血清优越得多。原因是一般抗血清是由一群甚至能够识别小个大分子上的不同抗原部位的各种抗体组成的。

杂交瘤技术最重要的优点是，可以从不纯的抗原分子中获得单克隆抗体；甚至在所需抗原仅占抗原混合物中极少比例的情况下，也能获得该抗原的单克隆抗体。其原因是，可以从产生各种不同抗体的各种杂交瘤混合群体中筛选出特异抗体的杂交瘤。原则上，可以做成抗细胞中任何蛋白的单克隆抗体，每种单克隆抗体可做为特殊的探针，用细胞学方法确定该蛋白在细胞中的部位，或用于纯化该种蛋白，以研究其结构与功能。

2.7 重组 DNA 技术

重组 DNA 的生化本质，就是将不同生物的目的基因在体外人工剪切组合并和载体(质粒、噬菌体等)DNA 连接，形成新的重组体 DNA 分子，然后转入适当的受体细胞，进行扩增并使转入的目的基因在细胞内表达，产生人们所需要的产物，或创建新的生物类型。这是基因工程最基本的技术。

重组 DNA 技术自 20 世纪 70 年代问世以来，理论研究和开发进展十分迅速，迄今已取得不少成就。在理论上，它是研究基因结构、功能和表达调控最强有力的手段，广泛应用于分子生物学、分子遗传学及医学等许多领域，促进了某些新学科的发展；在实践上，利用发酵工业进行微生物育种，生产激素、抗体、疫苗；在医学上，作为进行疾病基因定位、基因诊断和基因治疗的基础，前景光明。

重组 DNA 技术大体包括如下程序：①目的基因的获取；②核酸杂交构成重组 DNA；③重组 DNA 导入受体细胞；④筛选含有重组 DNA 分子的受体细胞。

2.7.1 目的基因的获取

目的基因即准备转移至受体细胞的基因，利用重组 DNA 技术构建嵌合 DNA 时，欲插入载体 DNA 的外源 DNA 片段中即含有我们感兴趣的基因或 DNA 序列——目的基因。目的基因有 2 种类型：cDNA 和基因组 DNA。目前获取目的基因的方法大致可用化学合成法、限制性内切核酸酶酶切法或分子杂交法等。

1. 化学合成法：如果已知某基因的核苷酸序列，或根据某种基因产物的氨基酸序列推导出该多肽编码基因的核苷酸序列，可利用 DNA 合成仪通过化学合成的原理合成目的基因。

2. 限制性内切核酸酶酶切法：利用限制性内切核酸酶将基因组 DNA 切割成基因水平的许多片段，其中含有我们感兴趣的目的基因片段。将它们与适当的克隆载体(载体 DNA)拼接成重组 DNA 分子，继而转入受体细胞扩增。

重组 DNA 技术中克隆载体的选择和改进也是一项很重要的工作。因为外源 DNA 片段离开染色体是不能复制的。如果将外源 DNA 连到复制子上，外源 DNA 则可做为复制子的一部分在受体细胞中复制。这种复制子就是克隆载体。载体必须在合适的受体细胞内独立复制。例如在大肠杆菌细胞中克隆常选用细菌质粒或 λ 噬菌体作载体。

3. 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)：在有模板 DNA、特别设计合成的引物及合成 DNA 所需的三磷酸脱氧核苷存在时，向 DNA 合成体系引入热稳定的 Taq DNA 聚合酶，以代替普通的 DNA 聚合酶。在多次热循环后，Taq DNA 聚合酶仍然具有活性，因此反应体系经反复变性、退火及扩增循环自动地、往复多次地进行感兴趣 DNA 片段的酶促合成，使反应产物按指数增长(图 2－10)。

如果已知某个基因的 DNA 序列，或根据多肽链氨基酸序列演绎出基因编码序列，结合序列信息设计引物，可直接利用基因组 DNA 或 cDNA 为模板，采用 PCR 技术获取目的 DNA。

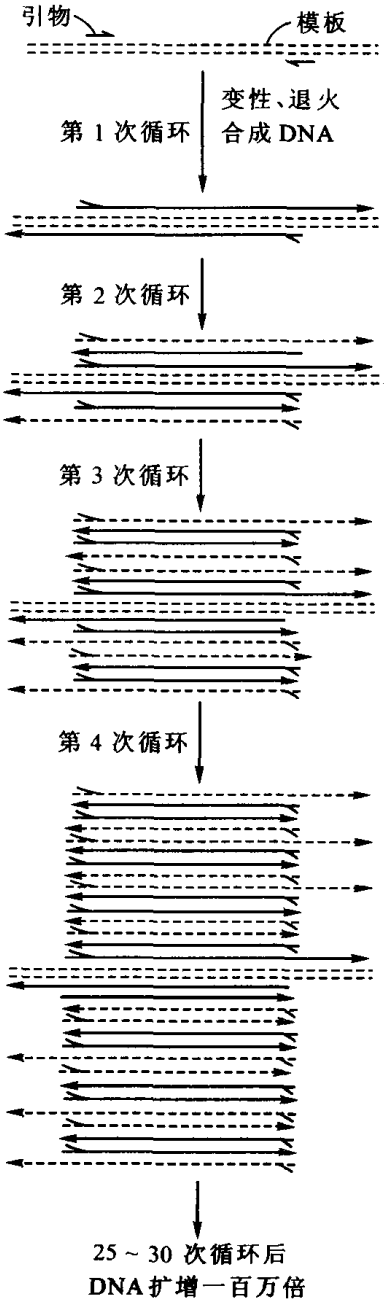


图 2－10 PCR 基本原理

PCR 操作体系中含有双链模板 DNA(它含有我们感兴趣的基因片段)、热稳定的 DNA 聚合酶(Taq DNA)及 1 对引物。设计引物时,需要考虑合成两条分别与模板 DNA 的两条链的 3'特定序列互补的寡核苷酸,并恰好使所选择的互补序列分别位于待合成 DNA 片段的两侧。此外,反应体系还应该含有供合成 DNA 时所需要的三磷酸脱氧核苷

在适当的缓冲体系中加入上述物质后,置于特殊装置(自动温度循环器),加热至高温(一般为 94℃,90 s)使模板 DNA 变性,再退火(55℃,2 min)使模板与引物互补成双链;再升高温度至 72℃,此时 Taq DNA 聚合酶即催化 DNA 的聚合反应(通常为 3 min或视情况而定)。以后再变性、退火、使聚合,如此循环改变温度,聚合反应重复进行。由于每一次温度循环所产生的 DNA 均可做为下次循环合成 DNA 的模板,所以目的 DNA 得以在两引物间按指数扩增,经历 25～30 次温度循环后可扩增一百万倍以上

2.7.2 核酸杂交构成重组 DNA

通过不同途经获取目的基因的外源 DNA 并选择适当的载体 DNA 后,下一步工作是如何将外源 DNA 与载体 DNA 连接在一起,即 DNA 体外重组。

许多限制性内切核酸酶酶切产生交错的切点,即在片段的两端都保留了短的单链末端,这种末端称为粘性末端,因为它们能与被相同酶酶切产生的其他末端形成互补的碱基对。一个环形 DNA 分子经过这类酶处理,得到一个切点后,通过退火,其粘性末端可以再形成一个环状 DNA 分子。这种酶切产生的粘性末端,在重组 DNA 技术上非常有用,因为它能使相同的限制性内切核酸酶切断两种 DNA 片段(目的基因和载体 DNA),使它们有相同的粘性末端,再用 DNA 连接酶在每个 DNA 链的相对端之间形成磷酸二酯键(图 2－11),使断点封闭起来。

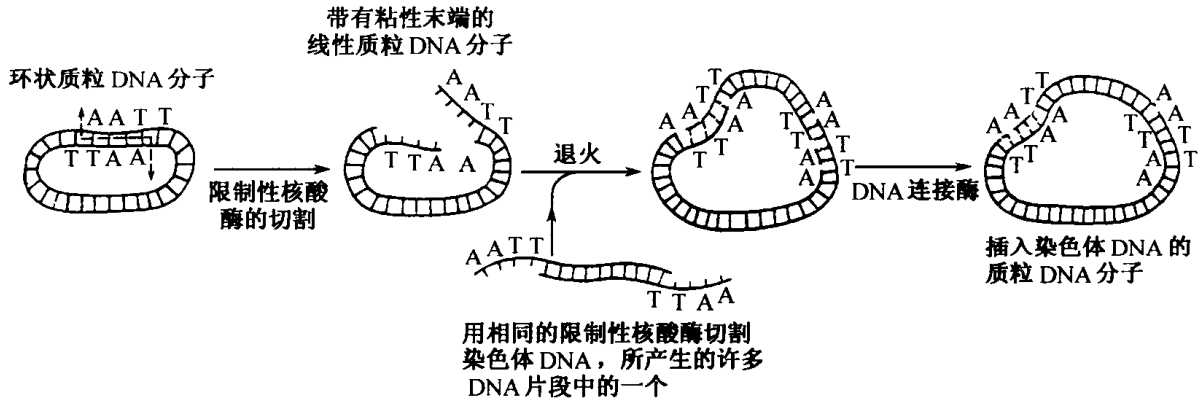


图 2－11 核酸杂交构成重组 DNA 的原理图

许多种限制性内切核酸酶所产生的粘性末端，可使 2 个 DNA 片段通过互补的核苷酸碱基对联合起来。以这种方式联合的 2 个 DNA 片段再通过 DNA 连接酶的催化，使断点共价连接(在本例中，杂交质粒 DNA 是由染色体 DNA 片段插入而形成的)

利用限制性内切核酸酶和 DNA 连接酶，可使任何 DNA 片段移植到自我复制成分(质粒、噬菌体)中去。

2.7.3 重组 DNA 导入受体细胞

外源 DNA(含目的 DNA)与载体 DNA 在体外连接成重组 DNA 分子后，需导入受体细胞。随着受体细胞生长、增殖，重组 DNA 分子也复制、扩增，这一过程即为无性繁殖，筛选出的含有目的 DNA 的重组体分子即为无性繁殖系或克隆。质粒(plasmid)是一种在细菌和酵母中自然存在的小的双链 DNA 分子，它们以独立的单位进行复制。虽然它们只占据了宿主细胞总 DNA 一小部分，它们却常常带有重要的基因，如抗抗菌素基因。正由于质粒 DNA 较小，并带有抗性基因，使之在重组 DNA 技术中得到广泛应用。

由于质粒 DNA 比宿主细胞 DNA 小得多，所以它们容易从宿主细胞中纯化出来。质粒作为克隆载体时，用一种限制性内切核酸酶切割纯化的 DNA 分子，然后与所要进行克隆的 DNA 片段退火。通过使细菌暂时对大分子通透的方法，把所形成的杂种质粒 DNA 分子引入到细菌中。通常只有一部分被处理的细菌摄入了质粒。根据质粒具有抗抗菌素的性质，在抗菌素中就能筛选出摄取质粒的宿主细胞，因为只有这类细菌才能在抗菌素存在的环境下生长。当细菌分裂时，质粒复制产生大量目的 DNA 片段的拷贝(图 2－12)。在繁殖终了时，进一步纯化杂种质粒 DNA 分子，再用相同的限制性内切核酸酶第

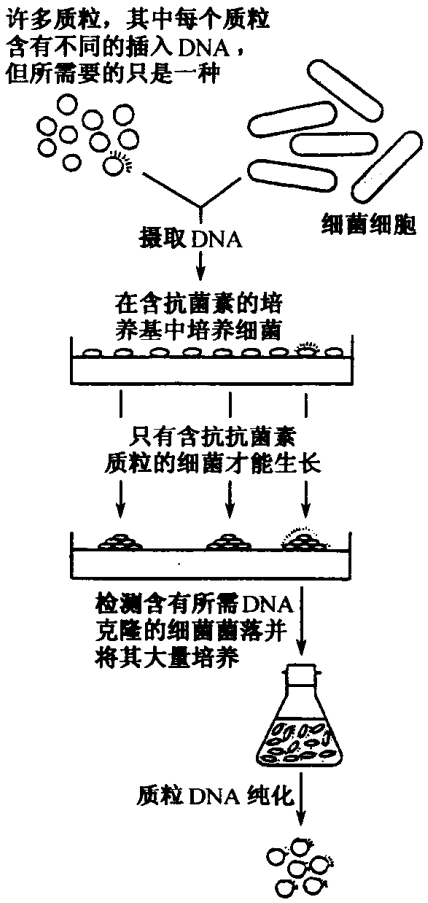


图 2－12 在细菌中通过 DNA 克隆来扩增和纯化特殊的 DNA 序列(用相同的方法也可在酵母中克隆 DNA 片段)

2 次切割,就可以分离出大量目的 DNA 片段的拷贝。

2.7.4 筛选含有重组 DNA 分子的受体细胞

用一种特殊的限制性内切核酸酶切割细胞全部基因组,就可得到所要克隆的 DNA 片段。用这种方法得到大量 DNA 片段,如从哺乳类的全部基因组中可以得到 $10^5 \sim 10^8$ 片段。因而在克隆过程中,可产生上百万个不同的细胞或酵母集落。每个集落细胞中都含有插入不同基因片段的质粒。所以,必须从大量集落中筛选出带有我们需要的基因组 DNA 片段,质粒的少数集落,并使之繁殖形成大量细胞群体或克隆。对所需集落的筛选是基因克隆过程中最困难的部分。最常用于识别带有特殊 DNA 片段克隆的方法是分子杂交法。

分子杂交法(molecular hybridization method)是利用 ^{32}P 标记的探针与转移至硝酸纤维素膜上的克隆的 DNA 片段进行杂交,直接选择并鉴定目的基因。

当用琼脂糖凝胶电泳把 DNA 限制性片段的混合物分散以后,用放射性克隆 DNA 探针可定位其中的特殊核苷酸序列。其方法是,把凝胶电泳上分离开的 DNA 片段,通过扩散或电泳转移到一张硝酸纤维素膜上,做成一个凝胶复制品,这个过程叫印迹。使硝酸纤维素膜与放射性 DNA 探针杂交,通过放射自显影就可辨认出与 DNA 探针互补的特殊核苷酸序列(图 2－13)。用同样的方法,硝酸纤维素膜也可复制生长在琼脂上的细菌集落,再用特殊的放射性探针与膜杂交,就可辨认出带有新克隆的特殊 DNA 片段的少数细胞。

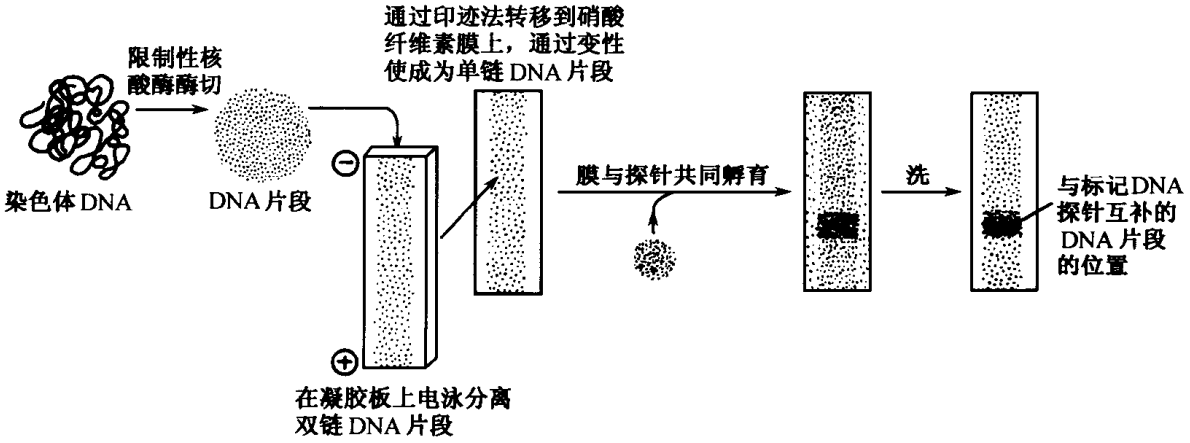


图 2－13 用限制性核酸酶酶切 DNA 样品后,通过电泳使不同大小的 DNA 片段分离,用印迹法将这些片段转移到硝酸纤维素膜上。在退火条件下使膜和放射性 DNA 共同孵育。反复冲洗膜,仅使与探针杂交的 DNA 片段保留放射性标记。在硝酸纤维素膜的放射自显影片上显出带有放射性标记的 DNA 片段的带

内 容 提 要

当代细胞生物学的发展都是由于引入了新的技术方法进行研究的结果,本章主要介绍细胞生物学的研究方法。作为观察细胞结构的基础,普通复式显微镜主要包括:①光学放大系统——目镜和物镜;②照明系统——光源、折光镜和聚光器,此外还有机械支架系统。相差显微镜主要改变了光学放大系统,微分干涉显微镜和暗视野显微镜主要改变了照明系统,

三者均可以用来观察和研究活细胞的动态变化；荧光显微镜术、视频反差增强显微镜术、激光扫描共焦显微镜术和定量细胞化学技术等结合，对细胞中各种生物大分子的定位、测量发挥了重要作用；透射电镜是观察细胞超微结构的基础，扫描电镜是观察细胞表面形貌的有力工具；扫描隧道显微镜术在纳米生物学研究领域具有独特的优越性。细胞培养技术是各种细胞生物学技术的基础；离心技术是分离和纯化细胞及其组分的常用方法；放射自显影技术可以研究各种大分子在细胞内的动态变化；DNA 重组技术使生物学科的研究进入了一个崭新的水平。

值得一提的是，如果能将各种技术巧妙结合，则可以解决更深入的问题。

思 考 题

1. 从光源、透镜和成像 3 方面比较电镜和光镜。
2. 说明对不同细胞、细胞不同组分进行分级分离所用方法的基本原理。
3. 概述 DNA 重组技术的要点及其应用。
4. 举例说明由两种技术相结合在当代细胞生物学研究中的应用。

参 考 资 料

1. 汪堃仁，薛绍白，柳惠图主编. 细胞生物学. 第 2 版. 北京：北京师范大学出版社，1998. 15～51
2. 翟中和，王喜忠，丁明孝主编. 细胞生物学. 北京：高等教育出版社，2000. 48～72
3. 张鸿卿，连慕兰主编. 细胞生物学实验方法与技术. 北京：北京师范大学出版社，1992. 1～225
4. Alberts B, Bray D, Johnson A, *et al*. Essential Cell Biology. New York & London: Garland Publishing Inc, 1998. 1～33
5. Lodish H, Baltimore D, Berk A, *et al*. Molecular Cell Biology. New York: Scientific Ameriean Books Inc, 1995. 148～261

第3章

细胞(质)膜

在所有细胞的表面包围着一层极薄的膜,称为细胞膜(cell membrane),又称为质膜(plasma membrane, plasmalemma)。除了质膜以外,在真核细胞中还有构成各种细胞器的膜,称为细胞内膜。相对于内膜,细胞膜也被称为外周膜。外周膜和细胞内膜统称为生物膜(biomembrane)。在原核细胞中,如细菌的细胞壁内侧也有质膜。有些细菌的质膜向细胞内延伸成为间体或质膜体(mesosome),具有真核细胞器的部分功能。其他比细菌小的支原体和病毒等也有质膜或类似于质膜的结构。

在漫长的生命进化过程中质膜的出现是一个重要的关键阶段,有了它才确定了细胞为生命的基本单位。质膜最基本的作用是维持细胞内微环境的相对稳定,并与外界环境不断地有选择地进行物质交换、能量和信息的传递,对细胞的生存、生长、分裂、分化都至为重要。

细胞质膜与不同的内膜,各有其不同的功能。但是它们基本的化学组成、分子结构和功能却有着共同特征,因此对质膜结构与功能的阐述也有助于对细胞内膜的了解。

3.1 膜的分子结构

由于质膜太薄在光镜下看不见,所以首先是从其生理功能——膜的透性开始研究。在19世纪后期,有的学者曾用500多种化学物对植物细胞透性进行上万次的实验,结果认为在细胞表面有类脂层。1925年荷兰两位科学家(E. Gorter 和 F. Grendel)用丙酮从红细胞中提取脂类,在水槽中制备单分子层,测量单分子层表面积恰为红细胞表面的两倍。由此得出结论:在质膜中的脂类分子必然是排列为连续的双层。脂双层的概念已为后来大部分膜结构模型所接受,但毕竟是未见到真正的质膜,有些学者对质膜的存在提出了怀疑,直到20世纪50年代在电镜下看到了质膜的结构。大量的质膜资料,其说不一。J. D. Robertson(1959年)提出了单位膜模型。他用超薄切片透射电镜获得了清晰的膜暗—亮—暗3层结构图像,厚约7.5 nm,认为脂双层厚约3.5 nm,在其内外表面的蛋白各约2 nm,并提出真核和原核细胞具有共同的膜结构——单位膜(unit membrane)(图3-1A)。Robertson的单位膜,澄清了关于膜厚度资料的混乱和分歧。现在提到单位膜就是指膜在电镜下的3层结构。

20世纪60年代以后,对单位膜的异议增加了,因为所有细胞都具有共同的单位膜结

构,这很难与膜的多样性和特殊性一致起来。在生命系统中一般功能的不同常伴随着结构的差异,而单位膜是假定所有细胞的膜都是相同的,显然这是矛盾。再者,不同膜的厚度不完全一样,其变化范围为 5～10 nm。由此促进学者们重新检查脂类和蛋白质相互作用的问题。因为应用了一些新技术(如红外光谱、旋光色散和圆二色相)分析证明膜蛋白主要为 α-螺旋球形结构,冰冻蚀刻电镜技术证明在脂双层中分布有蛋白颗粒。20 世纪 60 年代后期以来,又用电子自旋共振光谱(自旋标记)等新的物理学技术证明磷脂的脂肪酸链具有流动性,用荧光抗体标记的融合细胞也证明膜具有流动性。在此基础上又提出一些膜的分子结构模型。其中流体镶嵌模型受到广泛支持。

3.1.1 流体镶嵌模型

流体镶嵌模型(fluid mosaic model)是 S.J. Singer 和 G. Nicolson 于 1972 年提出的(图 3-1B),认为脂类双分子层是膜的"构架",球蛋白分子有的镶在脂双层的表面,有的则部分或全部嵌入其内,有的横跨整个脂双层。将膜上的蛋白质分为两大类,镶在膜内、外表面的称为外在蛋白(extrinsic protein)或周缘蛋白(peripheral protein);嵌入到膜内的蛋白或横跨全膜的蛋白称为内在蛋白(intrinsic protein)或整合蛋白(integral protein)。它的主要特点是:①强调了膜的流动性;②膜内蛋白质和脂类分子分布不对称。

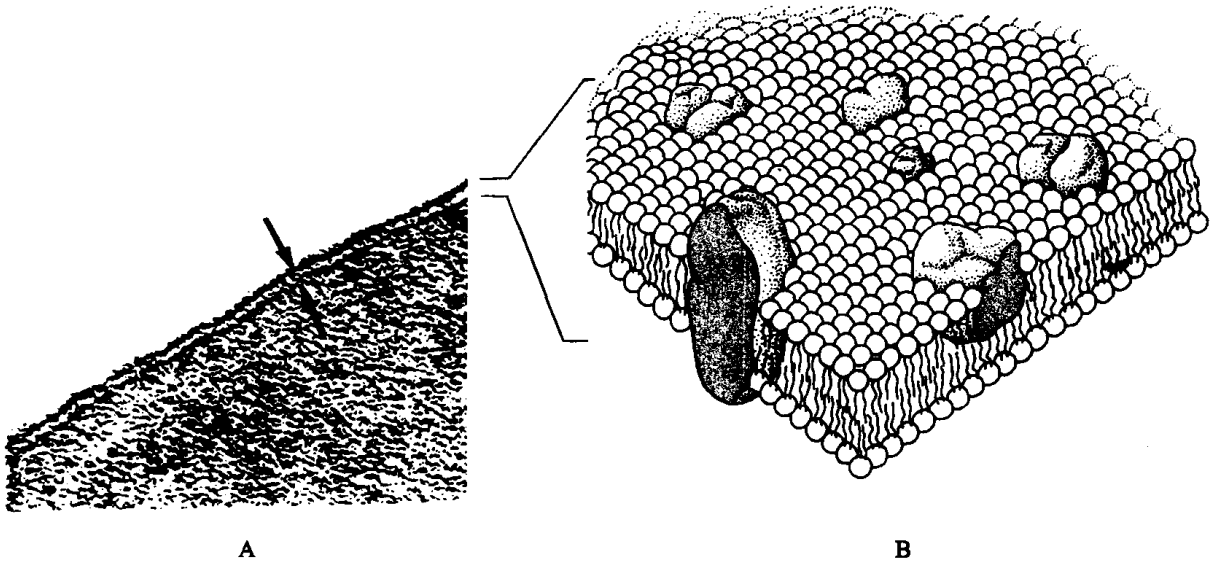


图 3-1 膜的结构模型

A. 单位膜,人红细胞膜电镜照片,箭头指其 3 层结构(引自 J.D. Robertson);
B. 流体镶嵌模型(引自 S.J. Singer, G. Nicolson)

他们认为,使膜分子聚在一起主要是蛋白-蛋白、蛋白-脂类、脂类-脂类的相互作用,主要是疏水的和亲水的两种非共价键(noncovalent)的相互作用。如果这两种非共价键的相互作用达到最大时,在最小自由能(free energy)情况下就能维持膜结构的稳定。在细胞内外水环境中,磷脂的非极性脂肪酸链和蛋白质的非极性氨基酸残基排斥与水接触达到最大程度,与此同时,膜蛋白、脂类和糖类的带电荷的极性基团与水接触,这时疏水的和亲水的各自相互作用是最大的。膜蛋白露在水介质部分,是由亲水的氨基酸组成的,嵌在脂双层的蛋

白质部分是由疏水的氨基酸组成的。并认为细胞中各种膜的不同活性和特异性,可能是由于膜内蛋白质的种类不同所致。大部分膜是不对称的,在其内部及内、外表面具有不同功能的蛋白质。在红细胞膜或其他细胞膜,只在膜的外表面有糖脂、糖蛋白等,这显然更为不对称,脂双层的内、外两层脂类分子也是不对称的。此模型认为膜的结构成分不是静止的,而是动态的,膜脂双分子层是像轻油般的流体,具流动性,能相当迅速地在膜平面进行侧向运动。这会使膜蛋白彼此或与膜脂相互作用,可能为某些代谢作用提供必需的条件。

由于实验技术不断创新和改进,现在对膜组分的动态结构、膜组分之间的关系、膜的不对称性、流动性等均作了大量深入的工作,不仅深化了对膜结构和功能的认识,也进一步支持、完善了"流体镶嵌模型"。对膜的分子结构现在已有了较为一致的看法(图 3-2)。

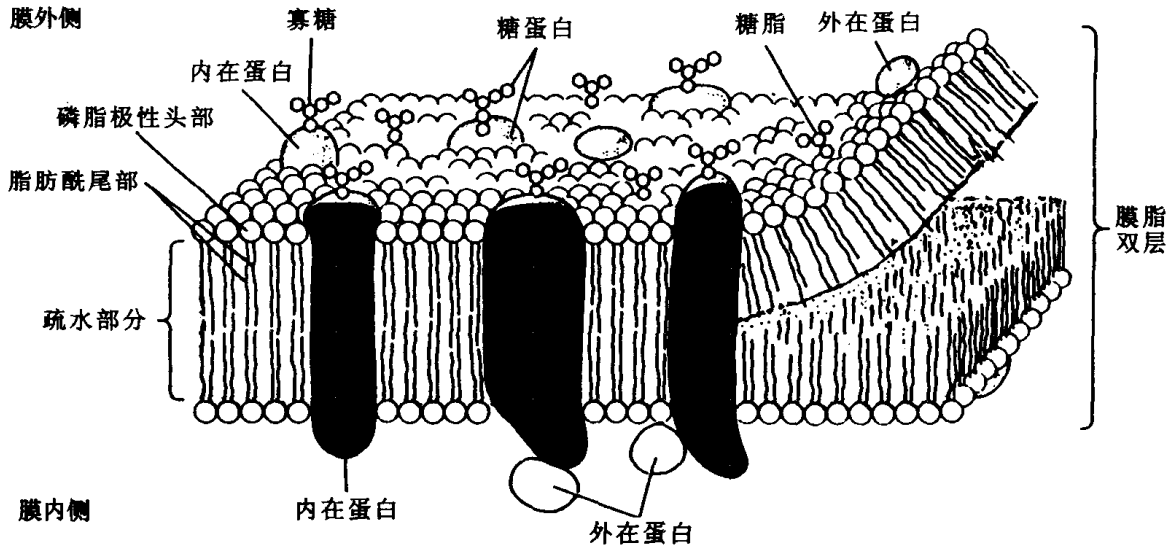


图 3-2 生物膜分子结构的一般模型(引自 J. Darnell, 等)

3.1.2 膜脂双层

膜脂双层是所有细胞膜的基础结构。构成膜的脂类有磷脂(phospholipid)、胆固醇(cholesterol)和糖脂(glycolipid),其中磷脂最为丰富。动物细胞膜的主要磷脂有磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine,也称卵磷脂)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine)和(神经)鞘磷脂(sphingomyelin)等。这些不同的膜脂在不同类型细胞膜中的含量、分布是不同的,即使不同动物的同一类型细胞质膜,其脂类含量也有较大变化。但是所有磷脂分子的一个显著特点是极性强。它是由磷脂酰碱基和脂肪酸两部分通过甘油基团(或鞘氨醇)结合而成。磷脂酰碱基部分较短,称为头部,由于集中磷酸和碱基,极性很强,是亲水的;脂肪酸部分是两条较长的碳氢链,称为尾部,是非极性、疏水的。这种一头亲水一头疏水的分子称为双型性分子(amphipathic molecule)或称"双亲媒性分子"、"兼性分子"(图 3-3、3-4A)。

糖脂也是双型性分子,普遍存在于动物细胞质膜脂双层的外层。它的结构与鞘磷脂很相似,仅由一个或多个糖残基代替了磷脂酰胆碱而与鞘氨醇的羟基结合。最简单的糖脂是半乳糖脑苷脂(galactocerebroside)(图 3-4B),只有一个半乳糖残基为其极性头部,这种糖

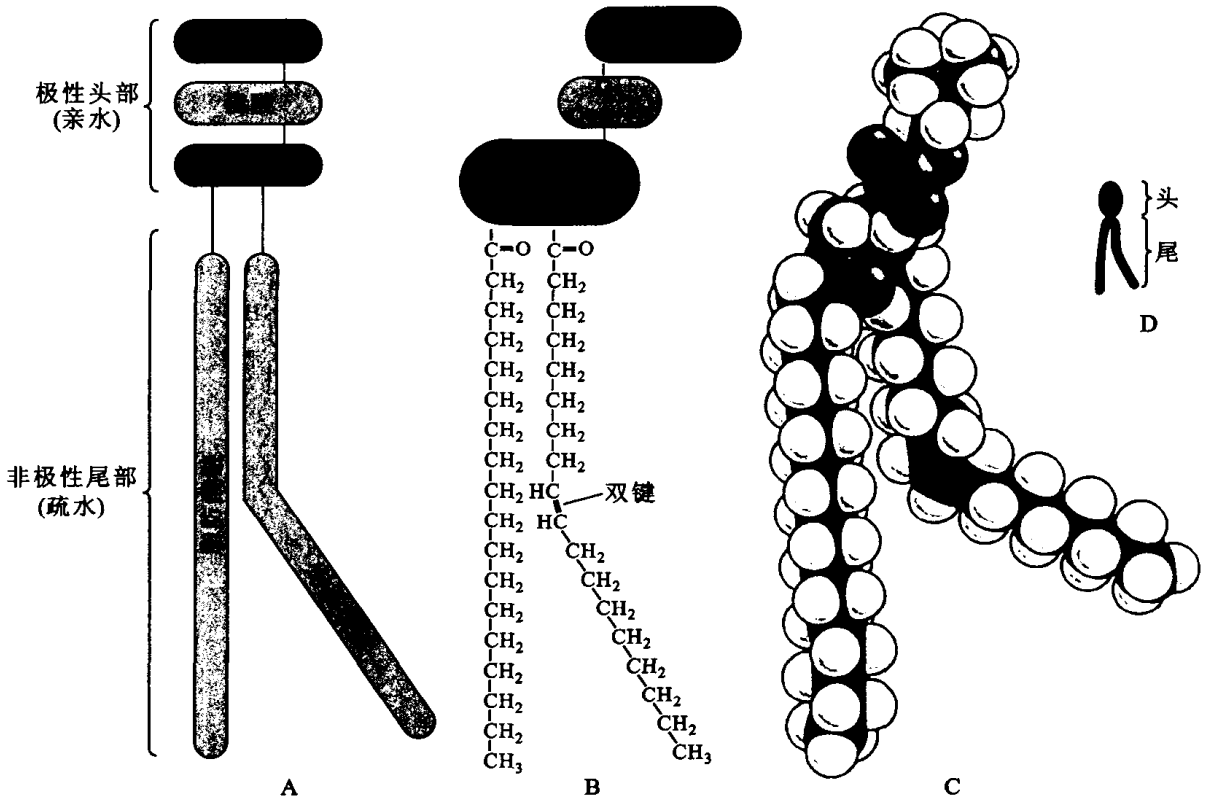


图 3-3 磷脂分子——磷脂酰胆碱

A. 图解；B. 化学结构；C. 分子结构模型；D. 示意图(仿 B. Alberts, 等)

脂在髓鞘的多层膜中含量丰富。变化最多最复杂的糖脂是神经节苷脂(ganglioside)(图 3-4B)，其分子头部有一个或几个唾液酸(N-乙酰神经氨酸)和糖的残基。神经节苷脂是神经元质膜特征性的成分，但也少量存在于多种动物细胞。儿童所患的一种致死性遗传病——Tay-Sachs 氏病，就是因为其细胞内缺乏氨基已糖酯酶，不能将神经节苷脂 GM_2 加工成为 GM_3，结果大量的神经节苷脂 GM_2 累积在神经和脑细胞中，导致中枢神经系统退化，以致死亡。神经节苷脂本身又是一类膜上受体，已知破伤风毒素、霍乱毒素、促甲状腺素、干扰素、绒毛膜促性腺激素等的受体就是不同的神经节苷脂。糖脂的种类繁多，与细胞识别、免疫功能等有关。

胆固醇在动物细胞质膜中含量较多，也存在于动物细胞的其他膜中。痕量的胆固醇也普遍存在于许多种植物细胞膜中(主要为谷固醇、豆固醇和麦角固醇)，原核细胞细菌的质膜没有胆固醇。胆固醇分子包括 3 部分：羟基团为极性的头部，类固醇环和一个非极性的碳氢尾部(图 3-4C)。这种化合物在膜中存在于磷脂分子之间，极性的头部与磷脂的极性端接近，非极性的尾部与磷脂的脂肪酸链接近，它对调节膜的流动性、对加强膜的稳定性有重要作用。

膜脂的种类多种多样，这是因为脂的极性头部有许多种，其脂肪酸链又有许多种，脂肪酸链的长短和饱和程度有多种不同，糖脂也因糖基不同而有许多种。这种膜脂的多样性适应于不同膜的功能。

由于膜脂都是双型性分子，使其具有一种独特的物理性质。如磷脂，当其处于水—空气(或油)界面时，分子的极性头部伸向水中，非极性的尾部则避开水面，伸向空气(或油)，如此

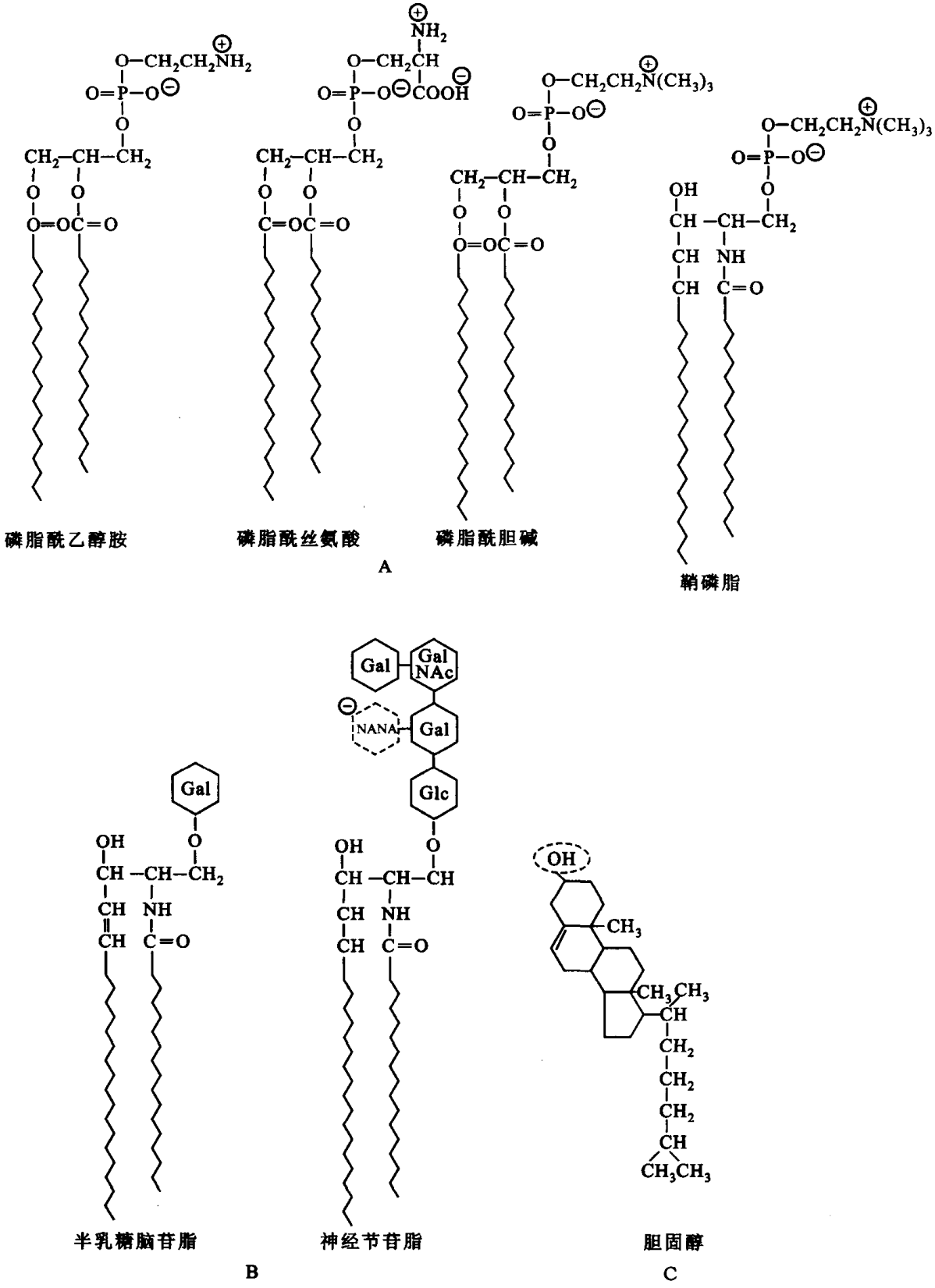


图 3－4　3 种类型的膜脂类

A. 磷脂——几种重要磷脂比较；B. 糖脂；C. 胆固醇。Gal：半乳糖；Glc：葡萄糖；GalNAc：*N* － 乙酰半乳糖胺；NANA：唾液酸

排列在界面上。在水环境中,磷脂分子聚集,其极性头部与水接触,非极性的尾部避开水向着分子团的内部,形成小球形的分子团(micell)或伸向分子双层的内侧,形成具有脂双层、大小不等(2.5 nm~1 μm)球形的脂质体(liposome)(图 3-5)。磷脂和糖脂分子在水环境中能自发地形成双层分子,而且脂双层又能自我封合成为脂质体。在生物膜中脂类的形成,看来是一个自我组装的过程。膜脂分子的这些特性及流动性,对其构成生物膜的主要组分很有意义。

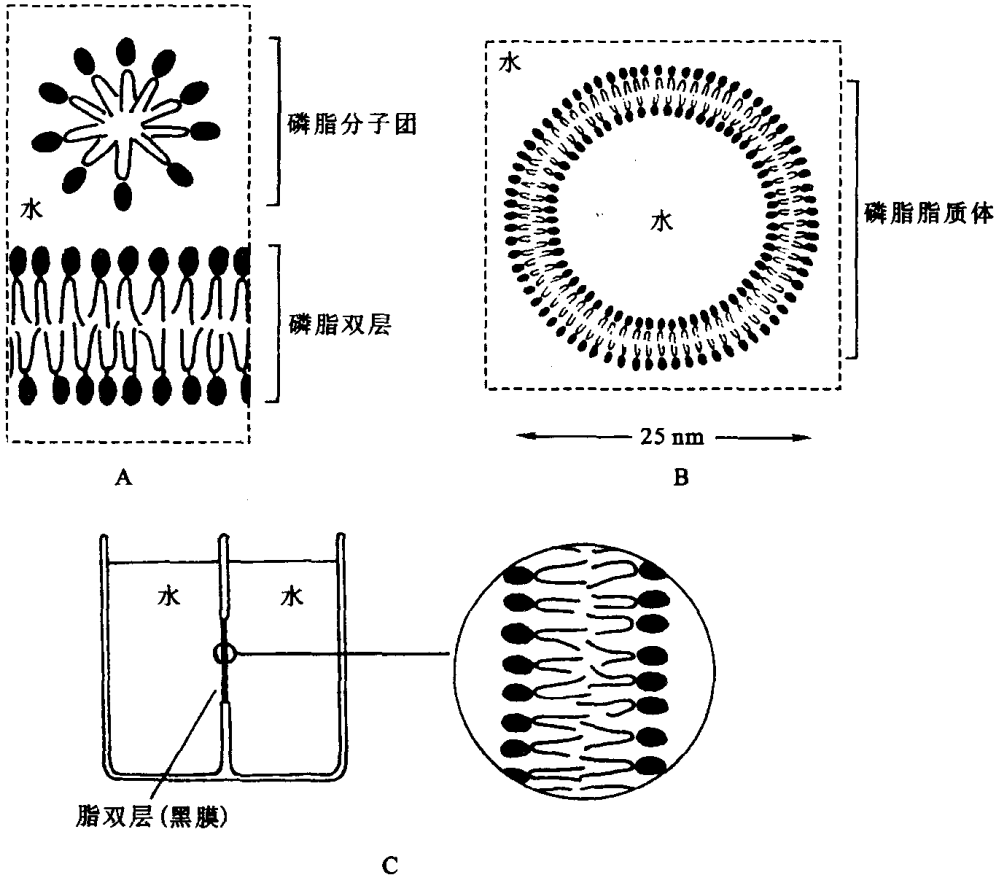


图 3-5 脂双层图解

A. 磷脂的分子团和磷脂双层(切面); B. 磷脂的脂质体(切面)在控制条件下可获得大小均一的脂质体,也可用不同的膜脂制备脂质体,还可嵌入不同的膜蛋白,进行种种实验研究; C. 用一隔板将水分成二个间隔,通过一小孔形成的人工脂双层(称为黑膜)常用于测量合成膜的透性(仿 B. Alberts, 等)

总的看,膜脂不仅构成膜的支架,为膜蛋白(包括酶)维持构象、表现活性提供适宜环境(一般膜脂本身不参与反应,但细菌例外),而且膜上很多种酶活性依赖于膜脂的存在。如果去掉脂类,酶蛋白即失去活性,加上脂类又可恢复其活性。有些膜蛋白只有在特异的磷脂头部基团存在时才有功能。磷脂的极性端对维持膜上酶蛋白的活性是必需的,其作用机理尚待进一步研究。

3.1.3 膜蛋白

膜蛋白是构成细胞膜的重要组分,膜的大部分功能主要由膜蛋白完成。因此在膜中蛋

白质的种类和数量反映了膜功能的复杂程度。如神经髓鞘主要为神经纤维的绝缘体，含有大量脂类，蛋白质只有约 25%(质量分数)。而功能较复杂的、参与能量转换的线粒体内膜和叶绿体片层膜，蛋白质含量可高达 75%左右(表 3－1)。一般真核细胞的质膜，含有多种酶、受体、运输蛋白等等，蛋白质含量约为 50%。

表 3－1　膜中蛋白质和脂类的比例

膜的类别	蛋白质	脂类	糖类
髓鞘	18	79	3
质膜			
人红细胞	49	43	8
小鼠肝细胞	44	52	4
变形虫	54	42	4
嗜盐菌紫膜	75	25	0
线粒体内膜	76	24	0
菠菜叶绿体片层膜	70	30	0

(引自 G. Guidotti)

在膜中的蛋白质，根据其在膜中所处的位置及与膜脂相互作用的方式不同，分为外在蛋白和内在蛋白。前者主要特点是分布在膜的内、外表面，为水溶性的，由离子键或其他较弱的键与膜表面的蛋白分子或脂类分子结合；后者嵌入脂双层，多为跨膜蛋白，它们的疏水区域与脂双层中脂类分子的疏水尾部相互作用，亲水区域暴露在膜的一侧或两侧表面，因此这些蛋白质亦为双型性分子，其中疏水性氨基酸比例较高。膜中的蛋白质大多为球形蛋白(图 3－6B)，内在蛋白的跨膜疏水部分多含有 1 个或 1 个以上的 α 螺旋结构。外在蛋白比较容

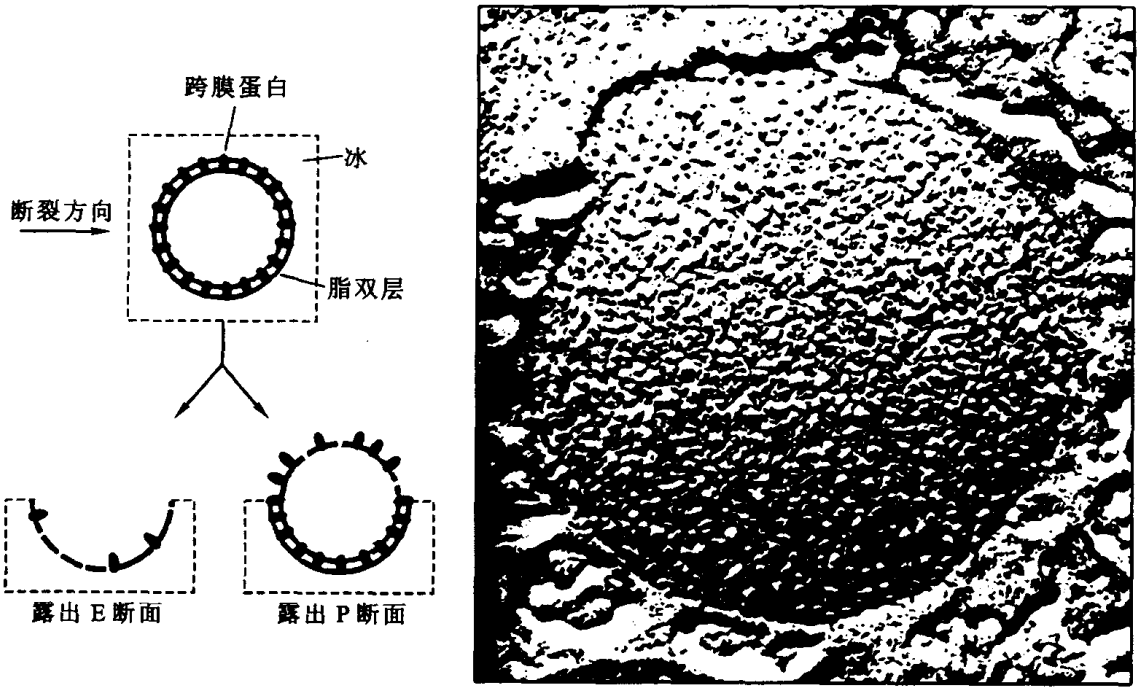


图 3－6　冰冻断裂蚀刻电镜术示脂双层中的蛋白质颗粒

A. 图解示冰冻断裂蚀刻电镜术，脂双层外侧的一半断面称为 E 面，内侧一半断面为 P 面，在两个断面上均可见蛋白颗粒；B. 由线粒体内膜制备的囊泡，经冰冻断裂蚀刻的电镜照片，示脂双层中大量的蛋白质颗粒(P 面)(A 引自 B. Alberts, 等；B 引自 A. E. Sowers)

易分离提纯，而内在蛋白则不易分离，分离后易失去其正常的构型。因此内在蛋白分离纯化的研究远远少于外在蛋白和非膜蛋白。

3.1.4 膜蛋白与膜脂的结合方式

膜蛋白如何与膜脂相结合是膜分子结构中的重要问题。已知膜的外在蛋白较易于分离研究，而内在蛋白与膜结合紧密，需要用去垢剂(detergent)来分离纯化膜蛋白(图 3－7)，再用凝胶电泳、二维电泳技术以及结合其他有关技术，如 X 射线衍射技术或者电镜技术与电子衍射分析相结合研究膜蛋白的三维结构，但要使所研究的内在蛋白结晶很困难。现在有学者正研究应用重组 DNA 技术，将编码某一内在蛋白(如一种运输蛋白)的 DNA 进行克隆和测序，以此来推导多肽链的氨基酸序列，从蛋白的序列分析检查多肽链的哪一部分是以 α 螺旋通过脂双层的(一般含 20～30 个氨基酸残基，具高度疏水性的节段)。现在常用 hydropathy plot 技术来分析确定 α 螺旋跨膜的次数。在这方面对红细胞膜蛋白和某些细菌的膜蛋白等研究较为深入，已确定不同的膜蛋白以不同的方式与膜结合。经实验证明主要有以下几类方式。

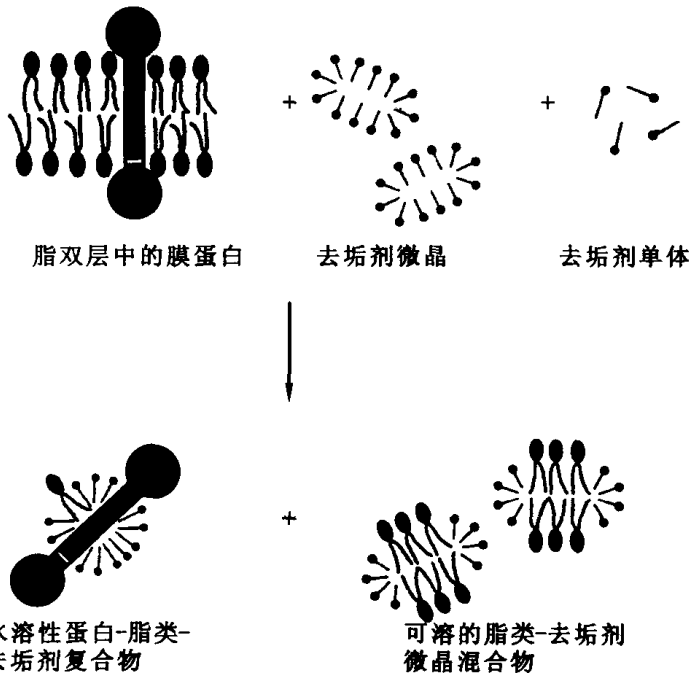


图 3－7 用温和的去垢剂溶解分离膜蛋白

常用的去垢剂有：离子型的，如 SDS 对蛋白的作用较强烈；非离子型的，如 Triton X-100 作用较温和。去垢剂是一种两性小分子，它破坏脂双层与膜蛋白的疏水的结合，成为水溶性的蛋白－脂类－去垢剂复合物，然后再进一步纯化(仿 B. Alberts, 等)

1. 膜蛋白以 α 螺旋单次或多次跨膜：许多膜蛋白横过脂双层，在膜的两侧各露出一部分，为跨膜蛋白(transmembrane protein)。大部分跨膜蛋白是以 α 螺旋构象横过脂双层。有些多肽链是一次以单一的 α 螺旋通过脂双层(图 3－8①)，为单次跨膜蛋白(single pass transmembrane protein)。有些多肽链多次以 α 螺旋通过脂双层(图 3－8②)，为多次跨膜蛋白(multipass transmembrane protein)。跨膜蛋白的疏水区域在脂双层内与脂类分子的疏水尾部相互作用，亲水的区域露在膜的两侧(图 3－9)。有些跨膜蛋白在细胞质侧的氨基酸(如半胱氨酸)残基共价结合脂肪酸链插入胞质面的脂单层中，加强了膜蛋白与脂双层疏水力的结合(图 3－8①)。跨膜蛋白横跨脂双层的节段大部分是由非极性侧链的氨基酸残基所构成。因为肽键本身是极性的，也因为无水，所以所有埋在脂双层中的肽键被驱动而彼此

形成氢键。如果多肽链形成有规则的 α 螺旋通过脂双层,在肽键之间氢键的形成达到了最大限度。大多数多肽链的跨膜节段就是这样横跨脂双层的。红细胞膜的血型糖蛋白(glycophorin)属于单次跨膜蛋白,斑带Ⅲ(band Ⅲ)、细菌视紫红质(bacteriorhodopsin)都属于多次跨膜蛋白(图 3-10)。

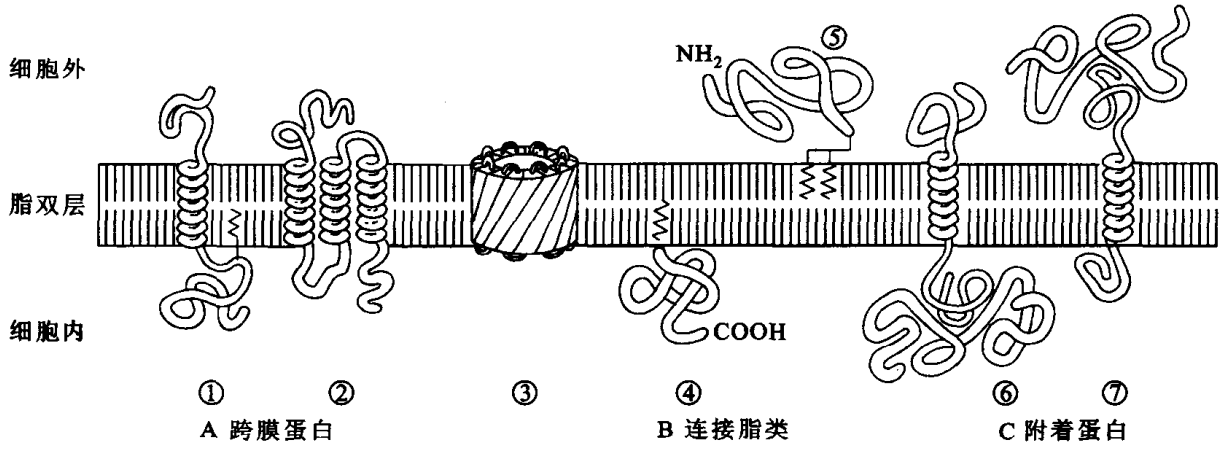


图 3-8　膜蛋白与脂双层结合的几种方式

①膜蛋白以单一 α 螺旋横过脂双层,有些具共价结合的脂肪酸链插入胞质面的脂单层;②多个 α 螺旋横过脂双层;③β 筒横过脂双层;④通过共价连接到脂类或脂肪酸链或异戊烯基团,插入脂双层胞质面的脂单层;⑤经寡糖连到非胞质面的脂单层的磷脂、磷脂酰肌醇;⑥⑦许多膜蛋白通过非共价键与其他跨膜蛋白相互作用连到膜上(仿 B. Alberts, 等, 1998)

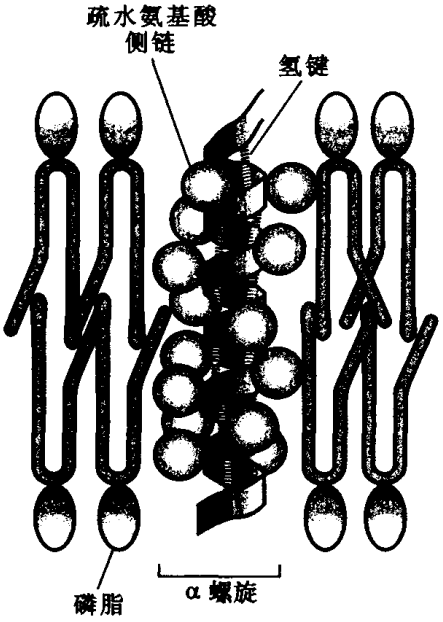


图 3-9　α 螺旋横跨脂双层的节段

示氨基酸形成 α 螺旋疏水侧链与磷脂分子疏水尾部接触,多肽主链亲水部分在螺旋内部彼此形成氢键,需约 20 个氨基酸横过膜(仿 B. Alberts, 等)

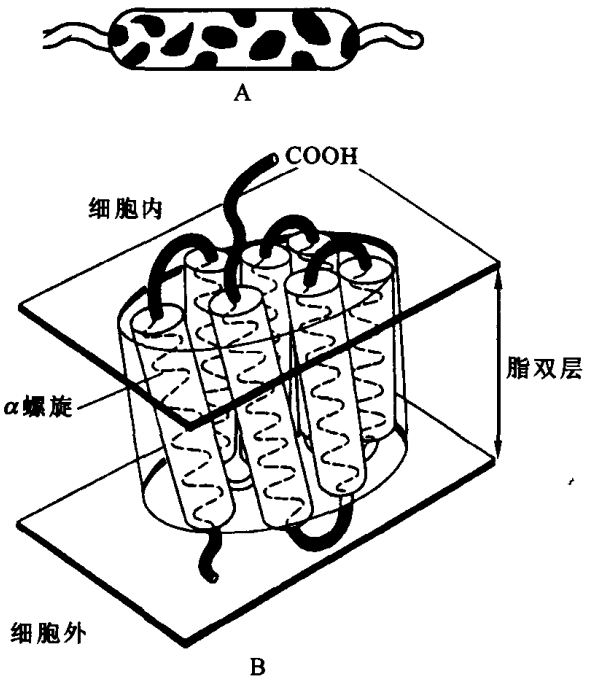


图 3-10　嗜盐菌(*Halobacteriun balobium*)视紫红质分子三维结构示意图

A. 嗜盐菌,示其膜中含有细菌视紫红质分子的紫膜斑;
B. 细菌视紫红质分子折叠成 7 个 α 螺旋横过脂双层
(引自 R. Henderson)

2. β筒(β-barrel)跨膜:一些多次跨膜蛋白,其跨膜节段不是α螺旋,而是排列成封闭的β片,通常称为β筒(图3-8③)。这可能是由于在脂双层中的肽键,在无水情况下,强的驱动力使氢键的形成达到最大限度所致。这类膜蛋白研究最清楚的是孔蛋白(porin)。孔蛋白是形成孔的跨膜蛋白,它是以β筒横过脂双层,存在于许多细菌包括大肠杆菌的外膜中。孔蛋白可形成三(聚)体(图3-11B),三体中每个单体形成一管形的β筒,在其中心有一充水孔。每个β筒由16股反向平行排列的β片充分弯曲卷成一筒状结构(图3-11A),有极性的侧链铺在里面成水通道,在β筒外侧伸出的非极性侧链与脂双层的疏水部分相互作用。许多细菌外膜具有种种不同的形成孔的孔蛋白,它选择性地使相对分子质量为600的亲水性溶质通过外膜。此外线粒体和叶绿体外膜形成孔的蛋白质结构上与之相关的也是β筒。

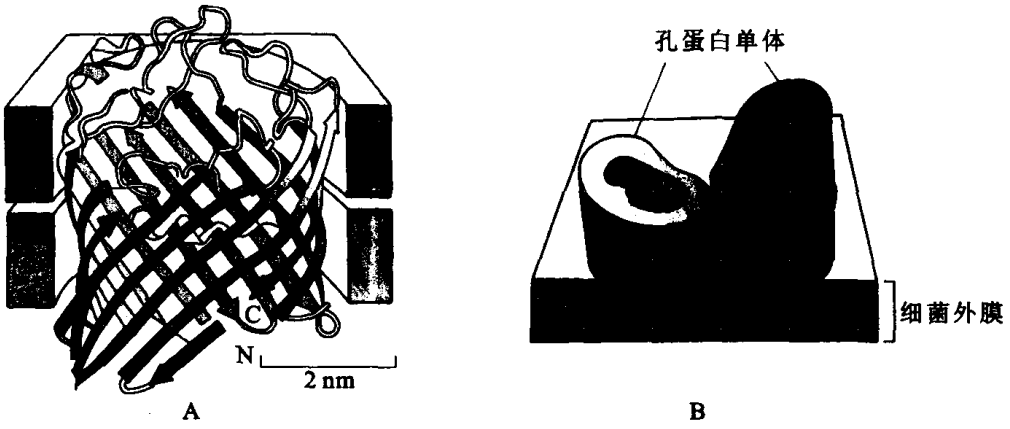


图3-11 荚膜红菌(*Rhodobacter capsulatus*)孔蛋白的三维结构

A. 每个单体由16股反向平行排列的β片构成β筒,为跨膜的水管道;B. 单体紧密结合形成三(聚)体,它有3个分开的管道,多肽链连接两个β股的一个长环,伸向每个管道,使管道腔变窄成为横切面为0.6 nm×1 nm(仿M.S.Weiss,等)

3. 形成大的蛋白复合物跨膜:细菌的光合反应中心(photosynthetic reaction center)是最复杂的跨膜蛋白结构,对其分子结构的了解是首次(1985)使跨膜蛋白结晶,并用X射线衍射分析获得的。这一结果对膜生物学的研究很重要,因为它首次显示多次跨膜蛋白的多肽链在膜内如何结合形成一种复杂的蛋白机制(图3-12)。这种光合复合物如何通过膜捕捉光能及用它通过膜泵出H^+的功能在叶绿体有关部分讨论。膜蛋白常排列成大的复合物,这不仅有利于收获各种形式的能,也有利于转换细胞外的信号为细胞内的信号。

4. 通过共价结合的脂类基团:有些膜蛋白在膜的内表面胞液中,仅以1个或多个共价结合的脂肪酸链或其他类型的脂链[如异戊烯基团(prenyl group)]与脂双层结合(图3-8④、3-13)。另一些膜蛋白在膜的外表面,完全露于膜表面,仅通过一共价连接(经过一特异寡糖),连到质膜外单层的磷脂酰肌醇锚锚定到脂双层(图3-8⑤)。

连接脂类的蛋白质(如图3-8④),在胞液中合成可溶性蛋白质,随着通过脂类基团的共价连接,被指导到膜上。但是图3-8⑤所示的蛋白质是在内质网(ER)上合成的单次跨膜蛋白,当其还在ER上时,切除蛋白质的跨膜节段,加上糖基磷脂酰肌醇锚[glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor],通过GPI锚将留下的蛋白质结合到膜的外表面。

5. 通过与膜蛋白非共价的相互作用:一些外在蛋白不能伸入脂双层,仅通过与其他跨

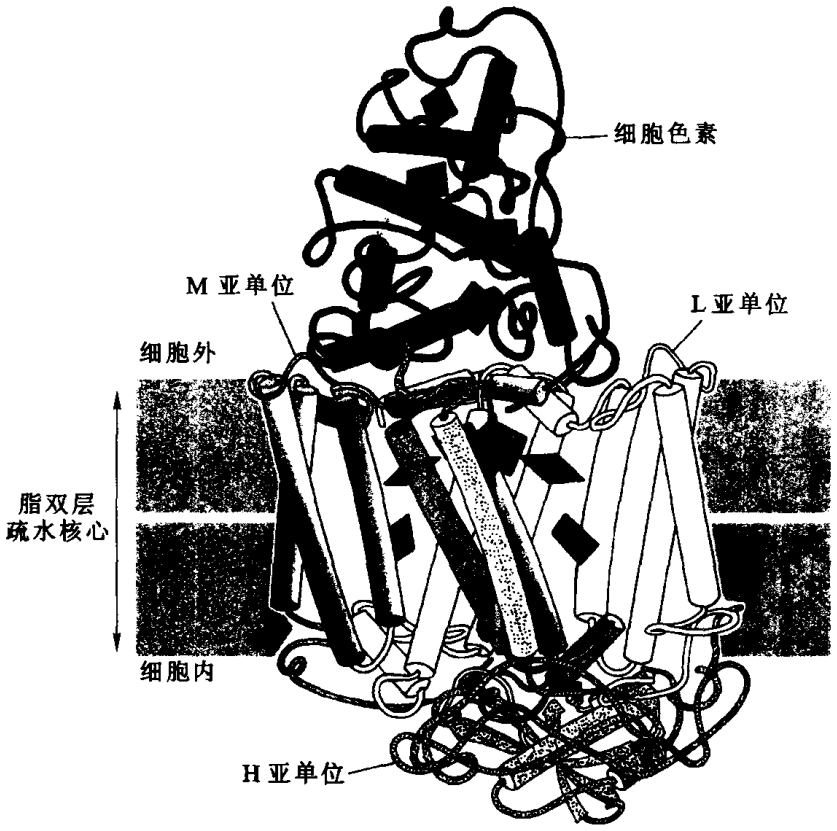


图 3－12　绿色红假单胞菌(*Rhodopseudomonas viridis*)的光合反应中心的三维结构
该复合物由 L、M、H 和细胞色素(cytochrome)4 个亚单位组成。L 和 M 亚单位形成反应中心的核心，每个亚单位包含 5 个 α 螺旋跨过脂双层，所有 α 螺旋以圆柱形表示，共价结合于蛋白亚单位的不同电子载体基团的位置以黑色表示，只有能被光激发的叶绿素分子的特异对在此图的中心以深色矩形表示，注意细胞色素完全结合到膜的外表面附于跨膜亚单位上(仿 J. Richardson)

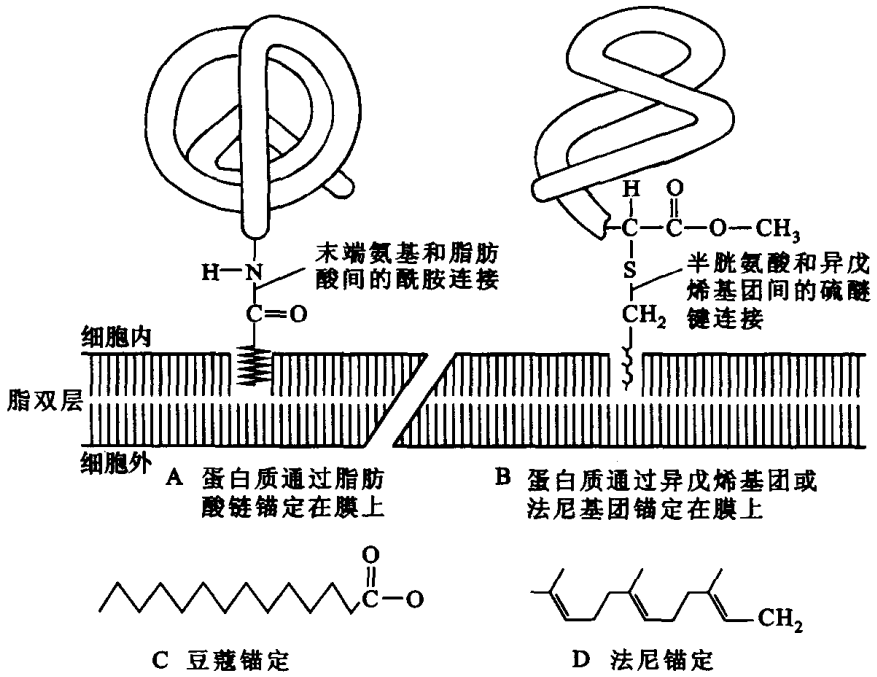


图 3－13　两种类型的脂类基团共价连接，有助于水溶性蛋白质在胞液中合成后定位于膜上
A. 脂肪酸[豆蔻酸(myristic acid)或棕榈酸(palmitic acid)]经过一个酰胺连接到氨基端的甘氨酸；B. 异戊烯基团(prenyl group)，或法尼基团(farnesyl)，经过硫醚键连接到羧基端的 4 个半胱氨酸残基，随着异戊烯的作用，端部的 3 个氨基酸被切除，且在插入膜以前新的羧基端被甲基化。这两种脂类锚定的结构示于：C. 豆蔻锚定(14 碳饱和脂肪酸链)；D. 法尼锚定(15 碳不饱和脂肪酸链)

膜蛋白非共价的相互作用结合到膜的胞质面或外表面(图 3－8⑥、⑦)。这类蛋白一般用相对温和的提取方法,如用高或低的离子强度或非常的 pH,即可从膜上分离下来。

3.1.5 膜的流动性

自 Singer 和 Nicolson 的"流体镶嵌模型"问世,膜的流动性已得到不少实验的证明和支持。由于实验技术不断创新,对生物膜组分运动状态的进一步研究,加深了对膜结构功能的认识。一般认为,膜的流动性(membrane fluidity)是生物膜结构的基本特征之一。早期的概念主要是指膜脂脂肪酸链的运动状态,现在认为,也包括了膜蛋白的运动。由单一磷脂所做成的人工脂双层,在特性凝固点(characteristic freezing point)时,可从液体状态变化到晶态(或称凝胶态),这种状态的变化称为相变(phase transition)。同样,构成膜的脂类,在一定温度下,可从流动的液晶态转变为晶态;晶态也可转变为液晶态。这种引起相变发生的温度称为相变温度。各种膜脂由于其组分不同而各有其相变温度。如果脂类的脂肪酸链短或具双键,则其相变温度低(即膜较难成为晶态),因为短链减弱了脂肪酸链尾部的相互作用,使其不易聚集在一起。

在人工脂双层中,具两种或两种以上的纯磷脂,当温度降低至某一值时,可发生分相(phase separation)。这是由于不同磷脂的相变温度不同,在某一温度时,有的已转变为晶态,有的仍为液晶态。处于这种不同状态的磷脂分子各自分别汇集,以致形成相的分离。在生物膜中脂类的组分比较复杂,即使在生理温度,也存在有分相现象,从而形成一些流动性不同的微区。大量的研究表明,在相变温度以上时,液晶态的膜脂总的是处于流动状态,而且膜脂分子具有不同形式的运动,膜蛋白也处于运动状态。

3.1.5.1 膜脂分子的流动性

用多种物理学技术——电子自旋共振、核磁共振、差示扫描量热术等来测量各脂类分子及其不同部分的运动。例如,电子自旋共振技术,即人工建立的脂类分子,使其极性头部基团携带一个"自旋标记",如硝基氧基团(nitroxide)(图 3－14)。这种基团包含一个不配对的

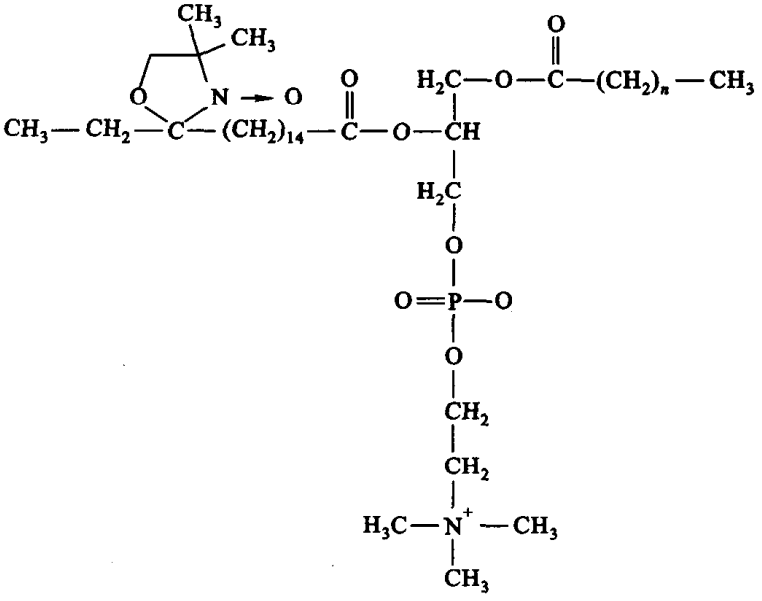


图 3－14 磷脂酰胆碱的自旋标记类似物

这一化合物用作自然的和合成的磷脂膜流动性的探针

电子,其自旋产生的顺磁信号能够通过电子自旋共振波谱术(electron spinresonance spectroscopy, ESR)检测出来。这样在膜的脂双层中自旋标记的脂类分子,其运动及方位都易于测量。这一类研究表明,脂类分子在相变温度以上的条件下,有以下几种运动方式(图 3-15):

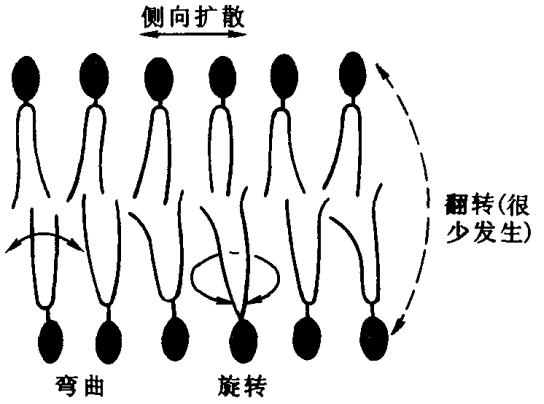


图 3-15　在脂双层中磷脂分子的几种运动方式

1. 侧向扩散(lateral diffusion):在膜平面脂类分子很容易与同一层邻近的分子交换位置,其速度相当快,约 10^7 次/s。这样产生快速侧向扩散,扩散系数(D)约为 10^{-8} cm^2/s。它意味着平均一个脂类分子在 1 s 内扩散的距离约为 2 μm(相当于一个大细菌的长度)。侧向扩散是膜脂的基本运动方式。

2. 旋转运动(rotation movement):膜脂分子围绕其长轴与膜平面垂直地进行旋转,运动的平均相关时间约为 10^{-6}～10^{-9}s,而且膜脂的脂肪酸链有韧性,可弯曲,最大程度的弯曲发生在脂双层的中心部分,最小程度的弯曲接近于极性头部。

3. 翻转运动(flip-flop):是指膜脂分子从脂双层的一层翻转至另一层的运动。人工脂双层分子很少发生,在 2 周中不多于 1 次,任一单个的脂类分子 1 个月不到 1 次,运动速度很慢。红细胞膜膜脂分子翻转运动的半存期约为 20～30 s。

此外,还有脂肪酸烃链围绕 C-C 链旋转而导致的异构化运动、膜脂脂肪酸链沿着与膜平面相垂直的轴进行伸缩振荡运动以及膜脂分子围绕与膜平面相垂直的轴进行左右摆动等。

3.1.5.2　影响膜脂流动性的因素

影响膜脂流动性的因素主要来自于膜本身的组成成分、遗传因子及环境的理化因素(如温度、pH、离子强度、药物等)。以下仅从膜脂组成成分的影响加以介绍。

1. 胆固醇的影响:动物细胞的质膜含有大量的胆固醇,有的几乎多至每有一个磷脂就有一个胆固醇分子(图 3-16)。胆固醇对调节膜的流动性有作用,在相变温度以上,它可使磷脂的脂肪酸链末端的甲基运动减小,即限制膜的流动性;在相变温度以下,可增加脂类分子脂肪酸链的运动,这样增强了膜的流动性。胆固醇也能加强膜脂双层的稳定性,在一种不能合成胆固醇的突变的动物细胞株,如在培养基中不加入胆固醇,细胞会很快解体;加进胆固醇掺入到膜内,稳定了脂双层,细胞会继续生存。胆固醇分子的羟基头部接近磷脂的头部基团,类固醇环与最接近头部基团的脂肪酸链区域相互作用,其余的脂肪酸链部分可以弯曲(图 3-16A)。大部分动物细胞质膜所存在的胆固醇的浓度,能阻碍磷脂脂肪酸链汇集、凝胶化,抑制温度引起的相变,以致在低温下膜的流动性不会剧烈降低。

2. 不饱和键含量和链的长度:膜脂脂肪酸链不饱和键的存在,会降低膜脂分子间排列的有序性,从而增加了膜的流动性(图 3-17)。膜脂脂肪酸链不饱和的程度主要通过细胞代谢来调节,这是细胞适应温度及其他变化而调节膜流动性的主要途径。此外,链的长度也与流动性有关,长链会使膜的流动性降低;短链能减低脂肪酸链尾部彼此相互作用的倾向,在相变温度以下,不易于凝集。

3. 卵磷脂/鞘磷脂的比值:哺乳动物细胞膜中,卵磷脂和鞘磷脂的含量约占整个膜脂的

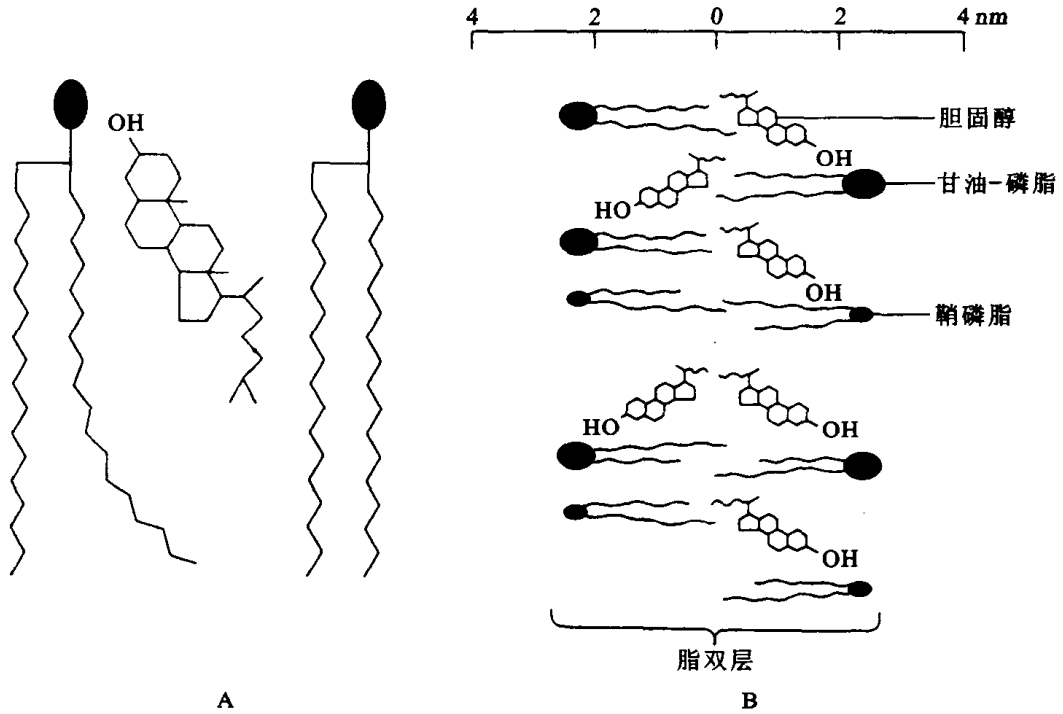


图 3－16 在膜中胆固醇与磷脂分子排列示意图

A. 胆固醇与磷脂分子的相互作用(仿 C.J. Avers)；B. 典型的髓鞘膜中磷脂与胆固醇分子的排列(仿 D. Caspar, D.A. Kirschner)

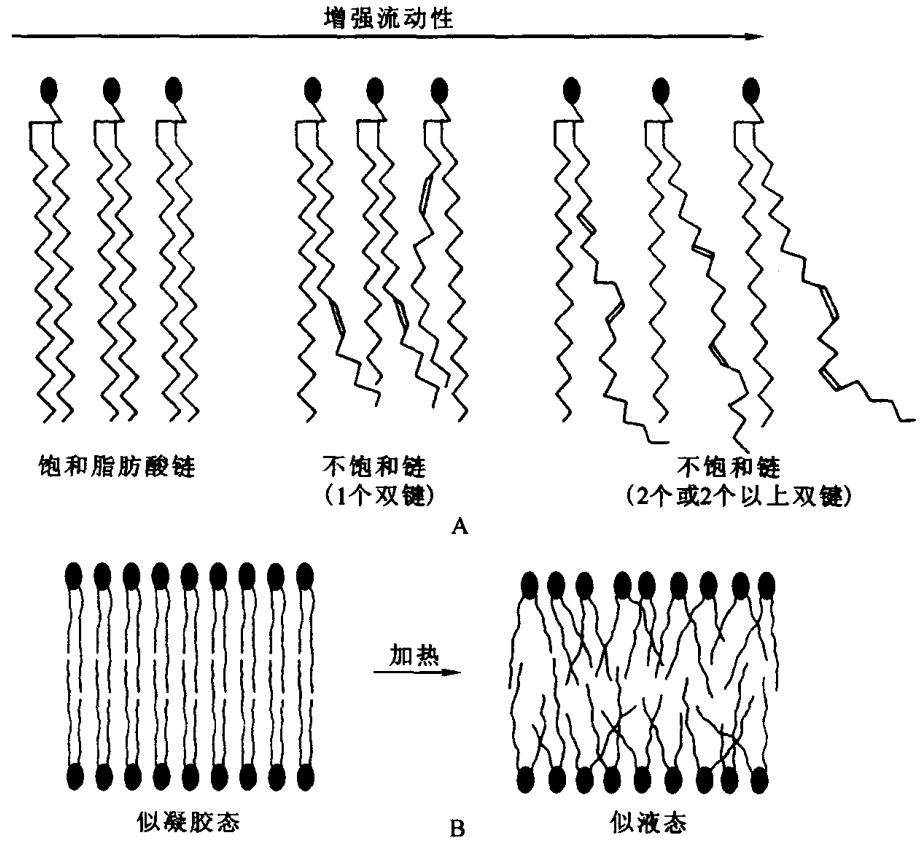


图 3－17 膜脂脂肪酸链不饱和键、温度对膜脂流动性的影响

A. 不饱和键存在程度与膜肪流动性；B. 温度对膜脂流动性的作用(仿 J. Darnell, 等)

50%。其中卵磷脂脂肪酸链不饱和程度较高,相变温度较低;而鞘磷脂则与之相反,其脂肪酸链饱和程度较高,相变温度也较高且范围较宽(25～35℃)。在 37℃时,卵磷脂和鞘磷脂二者虽都处于流动状态,但后者的微粘度值比前者大 5～6 倍。在细胞衰老过程中,细胞膜中卵磷脂/鞘磷脂的比值逐渐下降,其流动性也随之逐渐降低。

3.1.5.3 膜蛋白的运动性

膜中蛋白质分子的运动大致分为侧向扩散和旋转运动。

1. 侧向扩散:L. D. Frye 和 M. Edidin(1970)的实验是膜蛋白侧向扩散的一个证明。他们用间接免疫荧光测定细胞表面抗原的分布,将小鼠细胞和人细胞融合。用两种颜色的荧光染料标记抗体。绿色荧光染料(fluorescin)标记小鼠的抗体,红色荧光染料(rhodamine)标记人的抗体。标记后分别与小鼠和人细胞的抗原结合。然而将这两种细胞融合(图 3－18),开始一半是绿色,一半呈红色。在 37℃,40 min 后,两种颜色的荧光点呈均匀分布。这说明抗原蛋白在膜平面内经侧向扩散而重新分布。这个过程不需 ATP,如在低温(1℃)时,抗原蛋白基本停止运动。

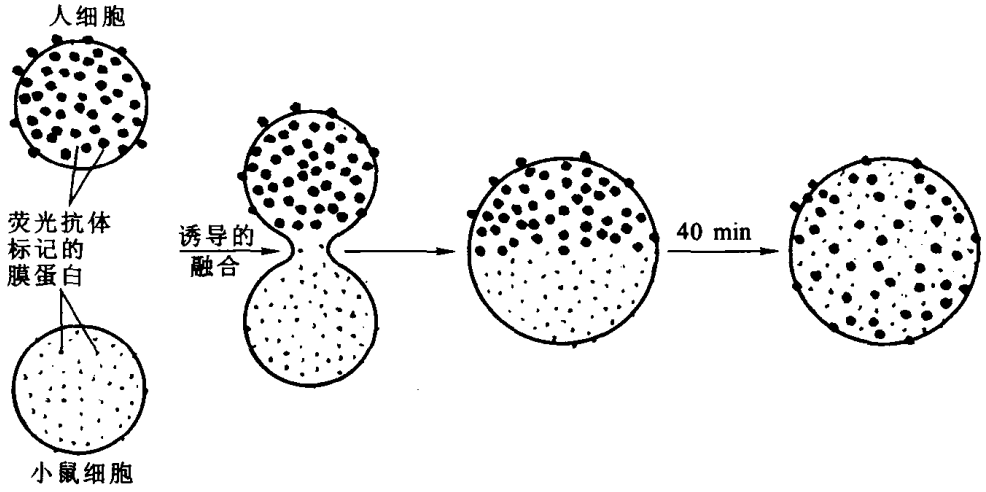


图 3－18 小鼠－人细胞融合过程中,膜表面抗原的运动性示意图

从抗体交联膜蛋白分子聚集成斑(patching)、成帽(capping)的现象也说明膜蛋白在膜平面的侧向扩散(图 3－19)。如淋巴细胞表面抗原与用荧光染料标记的相应抗体结合,由抗体诱导膜抗原蛋白聚集成斑(图 3－20)。如果抗体分子是二价的,它们有 2 个与抗原分子结合的位点,所以能交联邻近的膜抗原蛋白而成为一个个斑点。此外,在分子水平上应用抗体或外源凝集素与铁蛋白结合,也可看到膜蛋白的分布。由于铁蛋白是电子致密的,所以电镜下能看到各个分子(图 3－21)。

以上说明了膜蛋白在脂双层内能进行侧向扩散,但其扩散速度较慢。已测量了不同膜的多种蛋白分子的侧向扩散率,其扩散系数(D)变化范围为 $5\times10^{-9}\sim10^{-12}$ cm^2/s。有人认为内在蛋白扩散系数与其疏水部分半径的对数成比例。因此,一个相对分子质量约为 1.0×10^5的内在蛋白,其扩散系数仅为膜脂扩散系数的 50%左右。

2. 旋转运动或旋转扩散(rotational diffusion):膜蛋白,像膜脂一样,也能围绕与膜平面相垂直的轴进行旋转运动,但不进行翻转运动。不同内在蛋白的旋转速率有很大差异。这

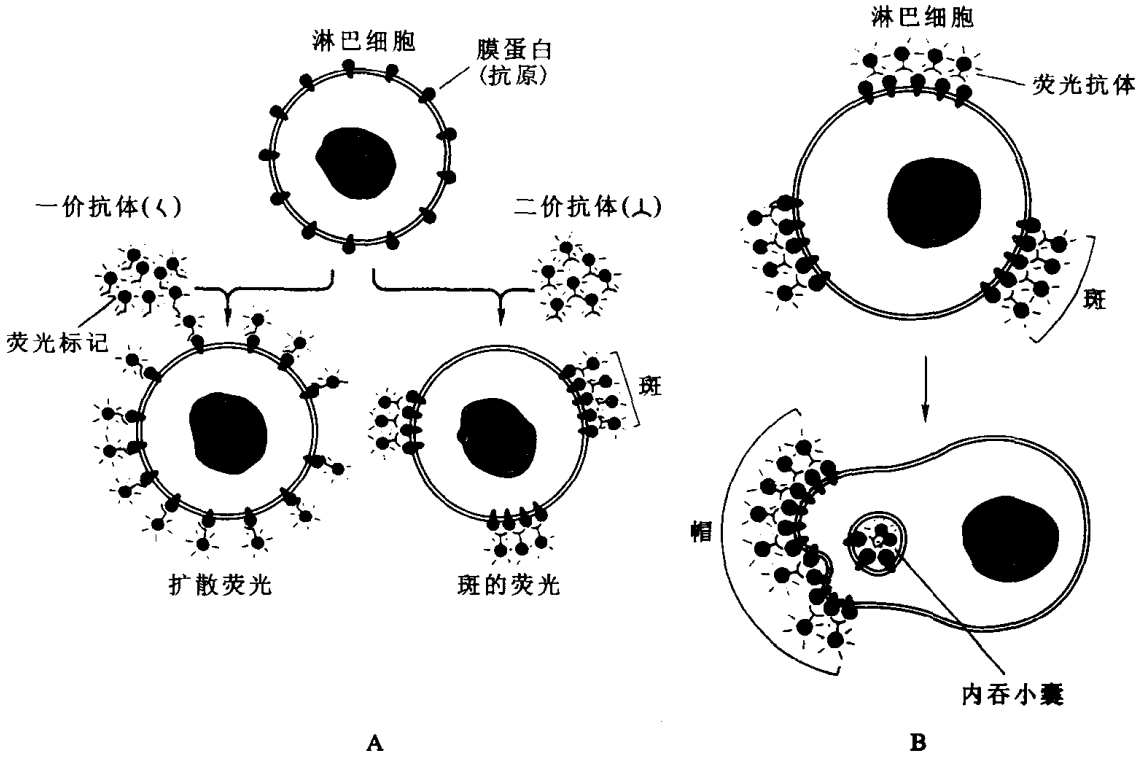


图 3－19 淋巴细胞膜抗原蛋白与二价抗体结合成斑(A)、成帽(B)示意图(仿 B. Alberts, 等)

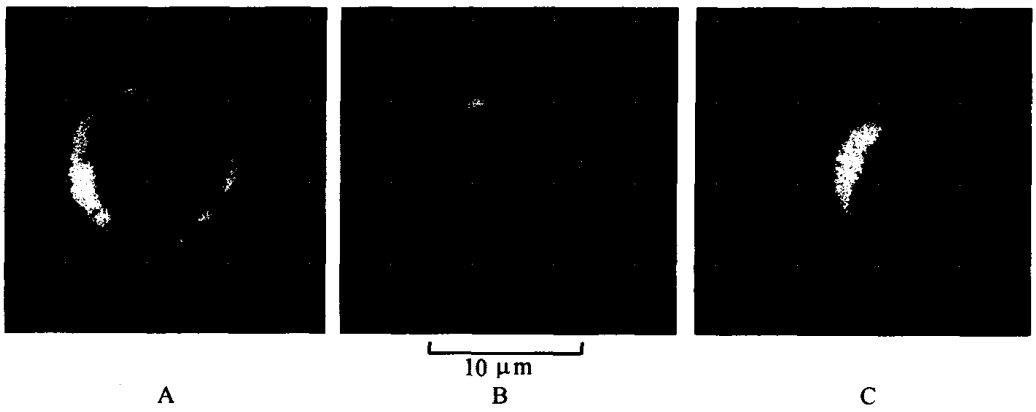


图 3－20 淋巴细胞免疫荧光显微照片

A. 单价抗体显示扩散染色; B. 双价抗体开始聚集成斑; C. 形成帽(转引自 B. Alberts, 等)

与蛋白质本身及其微环境的差异有关。如视杆外段盘状膜经磷脂酶处理去除磷脂后,其旋转扩散逐渐减慢;如果去除 70% 的脂类,则旋转扩散不再进行。

在脂双层中膜蛋白的运动性受到许多因素的影响和限制。如内在蛋白聚集形成复合物,使其运动减慢,内在蛋白与外在蛋白、细胞骨架成分以及与膜脂分子的相互作用均能影响或限制其运动。内在蛋白的运动性也会由于与膜内外表面结合的药物作用而受到增强或阻碍。红细胞膜是研究得较为详细的一例(图 3－22)。其内在蛋白斑带Ⅲ(band Ⅲ)与血影蛋白(spectrin)通过锚蛋白(ankyrin)间接地相互作用。斑带Ⅲ在膜平面中的侧向运动受到锚蛋白、血影蛋白纤维的限制。血影蛋白、锚蛋白和短肌动蛋白丝可以看做是细胞骨架纤维

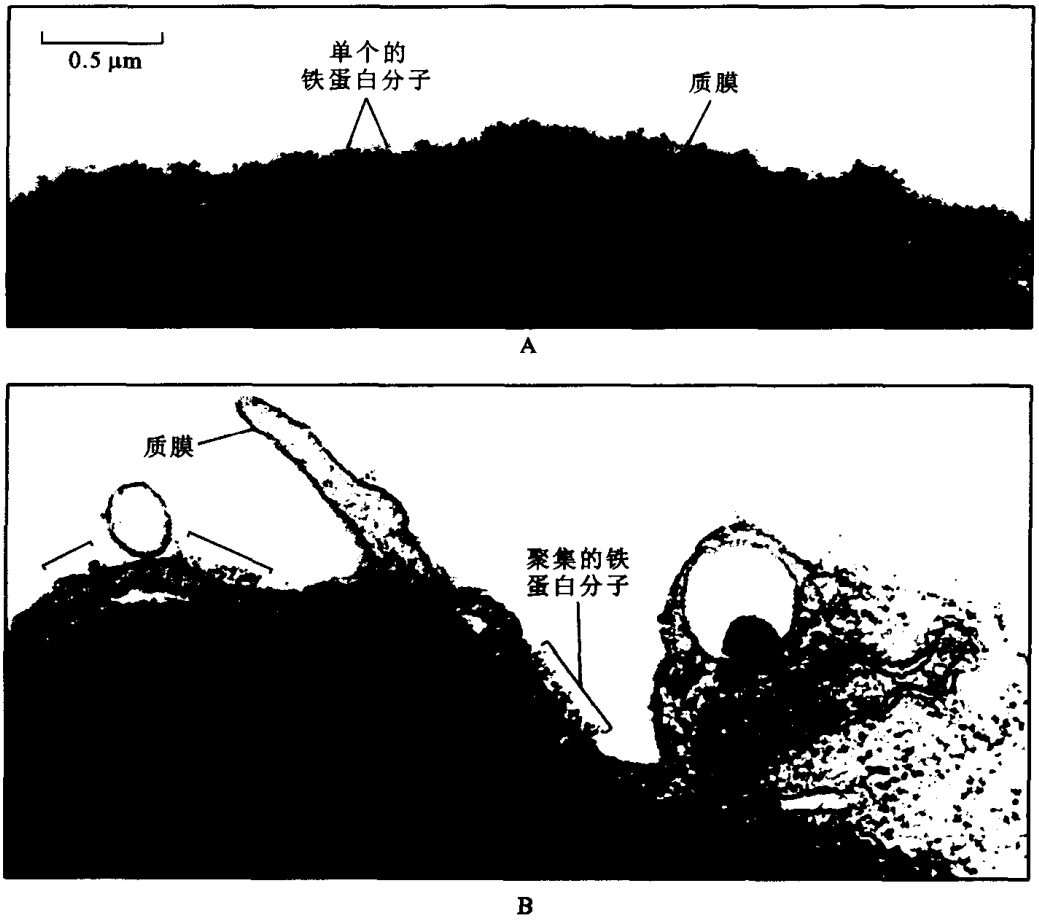


图 3－21　淋巴细胞表面铁蛋白结合抗体的电镜照片

A. 结合单价抗体；B. 结合双价抗体。每一个铁蛋白分子是一个黑点(引自 B. Alberts, 等)

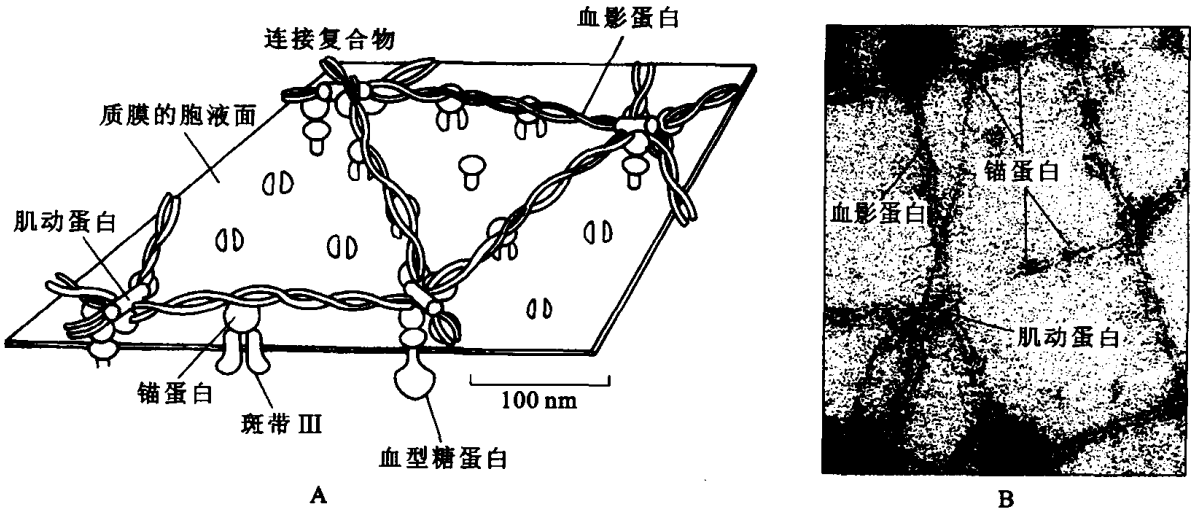


图 3－22　人红细胞膜的内表面(细胞质面)血影蛋白分子通过锚蛋白与斑带Ⅲ间接地相互制约

A. 图解；B. 电镜照片，示血影蛋白网(引自 T. Byers, D. Branton)

网和结合蛋白成分，也可看成为红细胞膜细胞质面的外在蛋白。其中肌动蛋白丝很短不太典型。较为典型的是肌动蛋白丝较长，通过其与膜内在蛋白结合，控制膜内在蛋白的运动性，但其作用性质，尚了解得很少。

3.1.5.4 膜流动性的生物学意义

膜的流动性对细胞的生活、对其表现正常的功能是必需的，因此它与细胞的许多功能有关。可以说它对细胞的作用是多方面的，已经实验证明有以下一些方面：

1. 膜上的酶活性与膜的流动性有关：例如，卵磷脂－胆固醇转酰酶（它催化脂肪酰基从磷脂的2位转到胆固醇的3羟基上）。通过对该酶活性曲线与温度使膜流动性变化的相关实验分析表明，膜上的酶活性与膜流动性是相关的。在一定范围内，膜的流动性大有利于膜中酶分子侧向扩散和旋转运动，使酶活性增加。对大肠杆菌膜上的NADH氧化酶和D－乳酸氧化酶的酶活性和温度关系的研究获得了相同的结果。对线粒体内膜ATP酶复合物活性与膜流动性关系的研究也说明这一问题。当猪心线粒体ATP酶复合物用胆酸盐稀释法重组于人工膜脂质体时，Mg^{2+}能显著提高重组酶的活性。ATP酶表现较高活性必须在一定的构象时，适宜的膜流动性是维持这种构象的必要条件，Mg^{2+}的作用不仅影响ATP酶复合物与磷脂的重组过程，也使磷脂分子维持适宜的流动性。

2. 膜的流动性与膜的物质运输的关系：在促进扩散和主动运输中，一些载体蛋白的运动性，决定于它们在膜中脂类分子的流动性。已经实验证明，一些特定的物质运输与膜的流动性相关。如K^+－缬氨霉素、β糖苷、α氨基异丁酸丁酯等物质的运输在实验的特定温度下有明显改变，用多种技术已证明此特定温度正与膜的相变发生相对应，说明了上述物质运输与膜流动性的关系。此外，通过膜的大分子运输——由受体介导的内吞作用，形成有被小囊（coated vesicles）等一系列过程，没有适宜的膜流动性是不能完成的。但是，目前还不能认为所有通过膜的物质运输都与膜流动有关。如，已知葡萄糖和尿苷通过人红细胞膜的促进扩散不受膜流动性变化的影响，短杆菌肽对K^+的运输也与膜的热致相变无关。

3. 细胞的信息传递，激素、药物的作用等与膜的流动性相关：在细胞膜上有信息传递系统，外界刺激通过膜将信息传递到细胞内引起一系列变化，最后作出相应的反应。如激素的作用，根据移动受体（mobile receptor）假说，受体与G蛋白、腺苷酸环化酶在膜上的位置是不固定的。当某种激素分子与膜上特异受体结合后，导致受体的构象发生变化，从而增加与G蛋白的亲和性。由于膜的流动性，结合激素的受体可侧向移动，一旦与G蛋白结合，又引起后者构象变化而被活化，然后活化了腺苷酸环化酶。可见，如果膜不具有流动性，激素就不可能有正常的作用。关于药物作用，已经实验证明局麻药和全麻药以及吗啡衍生物等均能显著影响膜脂从晶态到液晶态的转变。治疗癌症所用的蒽素和红必霉素是通过与膜脂的相互作用，增加膜的流动性而起作用。膜流动性的增加与药物的电荷无关，而与其结构掺入到脂双层特定位置的深度有关。

4. 在发育中膜流动性的变化：如幼年鼠脂肪细胞膜磷脂的饱和脂肪酸的含量较低，膜流动性较高；成年鼠则与之相反。一般，细胞通过代谢等方式调节控制膜的流动性，使其维持在相对恒定适宜水平以表现其正常功能。如果超出了调控范围，细胞则失去正常功能而发生病变。例如，β脂蛋白缺乏病和遗传性镰形红细胞型贫血患者的红细胞膜流动性明显低于正常人的；恶性淋巴瘤和白血病患者的淋巴细胞膜的流动性却显著高于正常人。

5. 在细胞周期中膜流动性的变化：应用顺磁共振技术研究中国仓鼠卵巢细胞膜流动性的

变化,结果表明,在细胞分裂期(M)细胞膜的流动性最高,在 G_1 期和 S 期膜的流动性最低。

6. 膜的流动性与农作物抗寒性的关系:在低温下细胞膜能否保持适度的流动性与作物能否抗寒密切相关。例如,零上低温造成的植物冻害问题,经分析认为,植物冻害与膜流动性有关。因为在零上低温时,细胞膜的流动性首先发生变化,从液晶态变为晶态,此时膜出现收缩龟裂、通透性增大、离子大量外渗;又由于膜流动性的降低或丧失严重地影响了结合膜的酶活性,致使呼吸受阻、能量供应不足,最后导致植物死亡。而在抗寒的作物品种,其细胞膜中脂肪酸的不饱和程度比不抗寒品种的大。这与脂肪酸的种类对膜流动性的影响是一致的。由此,可从膜的流动性研究植物的抗寒性,为定向培育抗寒品种提供方法和指标。

3.2 细胞被(细胞表面)

3.2.1 概 念

细胞被(cell coat)或称细胞外被。过去经组织化学和电镜研究,认为在质膜外面覆有一层粘多糖物质,且普遍存在于动物细胞表面。经化学和免疫研究表明,细胞被中的糖类寡糖链是与质膜的蛋白质分子、脂类分子共价结合形成糖蛋白、糖脂分子。糖蛋白的蛋白部分嵌于质膜的脂双层内;糖脂的脂类部分埋在脂双层中。糖蛋白和糖脂的糖链部分全部伸向质膜的外表面(图 3-23)。现已知蛋白多糖(proteoglycans)是一长的多糖链共价连接到蛋白的核心,主要存在细胞外,但在整合膜的蛋白多糖,其蛋白核心横跨脂双层,糖链伸展到膜的外表面,或通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚连到脂双层。因此,现在一般承认这些物质是细胞膜的正常组分。由于细胞被存在于细胞表面,所以也称为细胞表面(cell surface)。不过也有人将细胞表面作为细胞膜与细胞被的总称;或认为细胞表面包括细胞被、微绒毛和细胞外部结构;还有人认为细胞表面是由外被、质膜和质膜下胞质溶胶组成的。在哺乳动物小肠上皮细胞的细胞被又称为糖萼(glycocalyx),现在又有人将所有细胞被均称为糖萼。

在细胞被外侧,许多细胞常附有细胞外基质(extracellular matrix),主要为细胞分泌的含

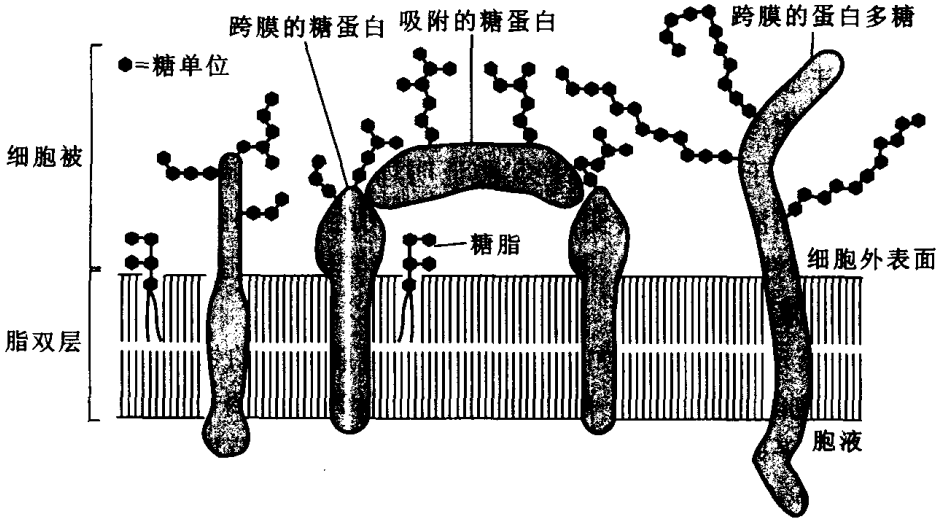


图 3-23 细胞被示意图(仿 B. Alberts, 等)

糖的大分子,如糖蛋白、蛋白多糖等等。这类物质在一些细胞很丰富,而在大部分细胞质膜外不那么明显,且细胞外基质与细胞被的糖蛋白、糖脂很难区分其界限。

实验证明,自然存在的有100多种单糖,其中仅约9种单糖存在于膜的糖蛋白和糖脂中。主要的为半乳糖(galactose)、甘露糖(mannose)、岩藻糖(fucose)、半乳糖胺(galactosamine)、葡萄糖胺(glucosamine)、葡萄糖(glucose)和唾液酸(sialic acid)。唾液酸残基通常存在于糖侧链末端,具负电荷,它是真核细胞的标志。糖脂和糖蛋白寡糖链通常不足15个糖残基,它们常有分支,通过不同的共价连接与一些糖结合。在不同细胞的细胞被内,单糖链的排列组合是多种多样的。

3.2.2 细胞被与分子识别

细胞被中存在多样性的寡糖以及其在细胞表面的位置,使其很适于细胞识别的功能。多年来,对这种猜想的功能没有多少证据。最近已证明,结合质膜的外源凝集素[或称植物血凝素(lectin)]能识别糖脂和糖蛋白特异的寡糖,介导各种暂时的细胞-细胞粘附的过程,包括发生在精子-卵的相互作用、血液凝固、淋巴细胞再循环作用以及发炎反应等等。

在发炎反应中发生的蛋白质-糖类的识别,是了解较清楚的一例。在机体局部发炎时,由发炎部位的细胞释放出局部化学介质(local chemical mediators)以信号通知该部位的血管内皮细胞表达其膜上存在的P选择蛋白(P-selectin)。选择蛋白是一种跨膜糖蛋白,属于细胞-细胞粘附选择蛋白家族(selectin family)。P选择蛋白的外源凝集素结构域能识别特异的寡糖链。这种特异的寡糖链存在于嗜中性白细胞表面的糖脂、糖蛋白的分子上(图3-24)。当嗜中

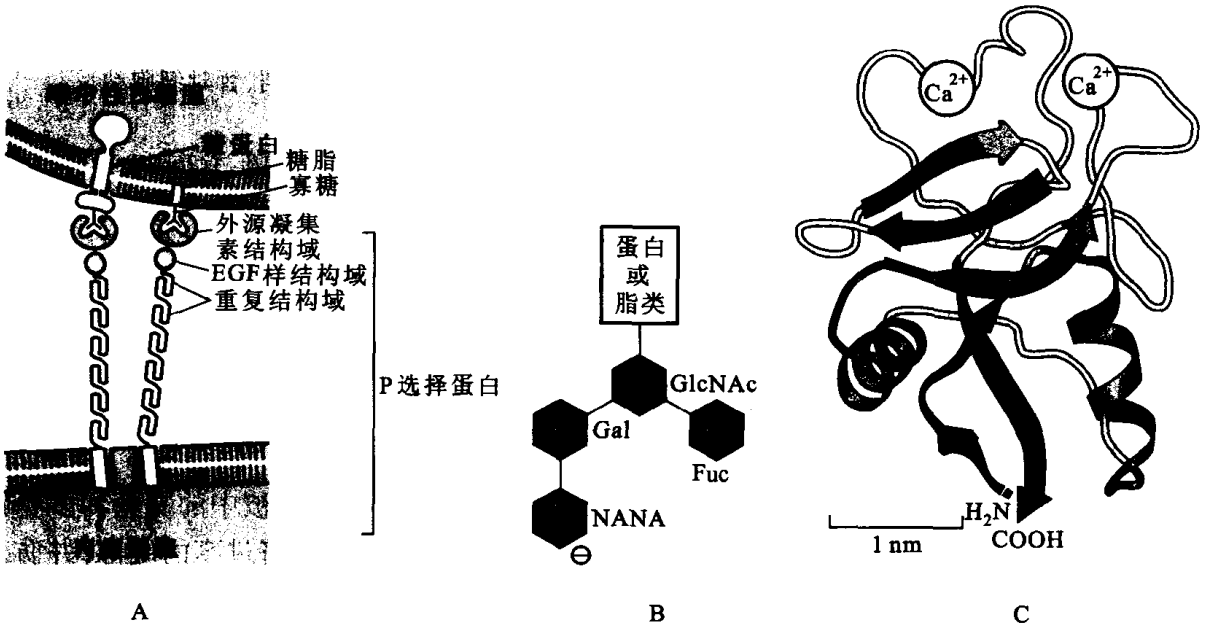


图3-24 嗜中性白细胞膜表面的糖脂、糖蛋白的特异寡糖链与血管内皮细胞膜表达的特异蛋白相互作用

A. P选择蛋白的外源凝集素结构域结合到特异的寡糖,选择蛋白的外源凝集素结构域同源于动物许多其他结合糖类的蛋白的外源凝集素结构域,由于结合到它们的特异糖配体需要细胞外的Ca^{2+}所以被称为C型的外源凝集素。这些外源凝集素之一,其三维结构已由X射线衍射技术确定示于C; B. 糖脂、糖蛋白的寡糖结构。Gal:半乳糖; GlcNAC:*N*-乙酰葡萄糖胺; Fuc:岩藻糖; NANA:唾液酸(仿B. Alberts, 等)

性白细胞从血液中被招募到组织发炎部位,开始时嗜中性白细胞粘附到该部位的血管内皮细胞,发生蛋白 - 糖类的识别过程;然后附着加强,并通过相邻内皮细胞之间爬行移出血管(图 3 - 25)。每一外源凝集素结构域结合寡糖的亲和性相当低,结构域与寡糖结合和其后的分离发生得很快,这就使得通过的血细胞快速地与选择蛋白结合到血管壁上,同时由血流推动附着的细胞沿着内皮细胞滚动。滚动停止是由不同组的跨膜蛋白介导完成的。整合蛋白被活化,加强了细胞 - 细胞粘附,使嗜中性白细胞停止滚动,并爬出血管外到感染的组织中。在淋巴细胞移出血流进入淋巴结也发生相似的选择蛋白 - 介导和整合蛋白 - 介导的粘附顺序。

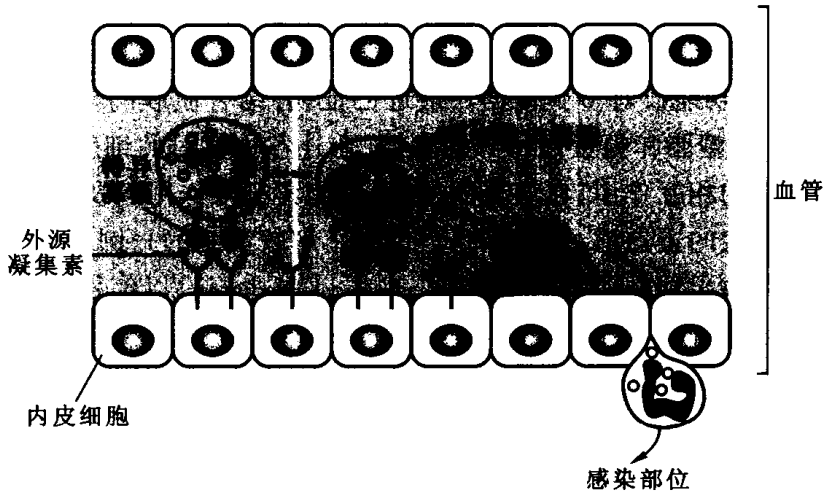


图 3 - 25　在发炎反应中,嗜中性白细胞表面的寡糖与蛋白的分子识别、暂时细胞粘附及移出血管示意图

由发炎部位细胞发出信号使该处的血管内皮细胞表达其膜上存在的特异的跨膜蛋白(是一种 P 选择蛋白,也可称为外源凝集素),这些蛋白能识别在血液中的嗜中性白细胞表面糖脂、糖蛋白的特异寡糖基团。这种分子识别是嗜中性白细胞从血液中迁移出血管的第一步。其后嗜中性白细胞粘附到血管壁,这种结合不是很强,接着附着加强(图中未表示),它有助于嗜中性白细胞从内皮细胞之间迁移出血管,进入感染部位的组织(仿 B. Alberts, 等)

不同的选择蛋白在白细胞、血小板和内皮细胞表面的表达,它们在血流中暂时的细胞 - 细胞相互作用中有着广泛的作用和意义。

细胞被处于细胞表面,能保护细胞免受机械和化学损伤。在细胞被中的寡糖和多糖链能吸收水分,使细胞表面粘滑,这有助于一些能动的细胞,如白细胞,挤过窄的缝隙,并防止血细胞彼此粘着或粘着到血管壁上。除此,它与细胞的许多重要功能有关,如上述的细胞 - 细胞识别和粘附、细胞与环境的相互作用、细胞增殖的接触抑制等。此外,膜抗原包括血型抗原、一些特异性受体和一些有关的酶均埋藏在细胞被内。有几种细胞表面抗原已作过较细致的研究,其中血型抗原不仅研究深入,而且也是说明细胞被中糖类作用的最好例证。

3.2.3　细胞被与血型抗原

每个人都有他自己的血型:A 型、B 型、AB 型或 O 型。这是由于在人的红细胞被中存在 A 抗原、B 抗原、A 和 B 抗原(AB 型)或者没有 A、B 抗原而具 O 抗原(或称 H 抗原,O 型)。

这些抗原受遗传控制。ABO 血型抗原是人红细胞的主要抗原。ABO 抗原是糖脂类,其脂类部分为鞘磷脂,具有能决定抗原性质的寡糖部分。A、B 和 O 抗原在结构上有相关的寡糖。O 抗原包括岩藻糖、半乳糖、*N* - 乙酰葡萄糖胺(*N*-acetylglucosamine)和葡萄糖。A 抗原和 B 抗原的寡糖链除了与 O 抗原的相同外,A 抗原还有一 *N* - 乙酰半乳糖胺连到外侧的半乳糖残基上;B 抗原还有一半乳糖连到外侧的半乳糖上(图 3 - 26)。所有人都有合成 O 抗原的酶,A 血型的人还有加 *N* - 乙酰半乳糖胺的酶;B 血型的人还有加半乳糖的酶;AB 血型的人能合成 AB 抗原;O 血型的人仅能合成 O 抗原不能合成 A、B 抗原。在人血清中含有天然抗体,如 A 血型的人有 B 抗体;B 血型的人有 A 抗体;AB 血型的人无 A、B 抗体;O 血型者有 A、B 抗体。因此输血时 A 型血不能输给 B 型血,反之亦然;一般认为,O 型血是万能供血者,可输给 ABO 血型的任何人而不发生抗原 - 抗体凝集反应,而 AB 型血可接受 ABO 血型任何人的血,是万能受血者。但实际上,如果大量输血时,由于 O 型血有 A、B 抗体,也有发生凝集反应的危险;又由于人类细胞血型系统较复杂,即使相同血型,也需进行血型配合检测,方可进行输血。

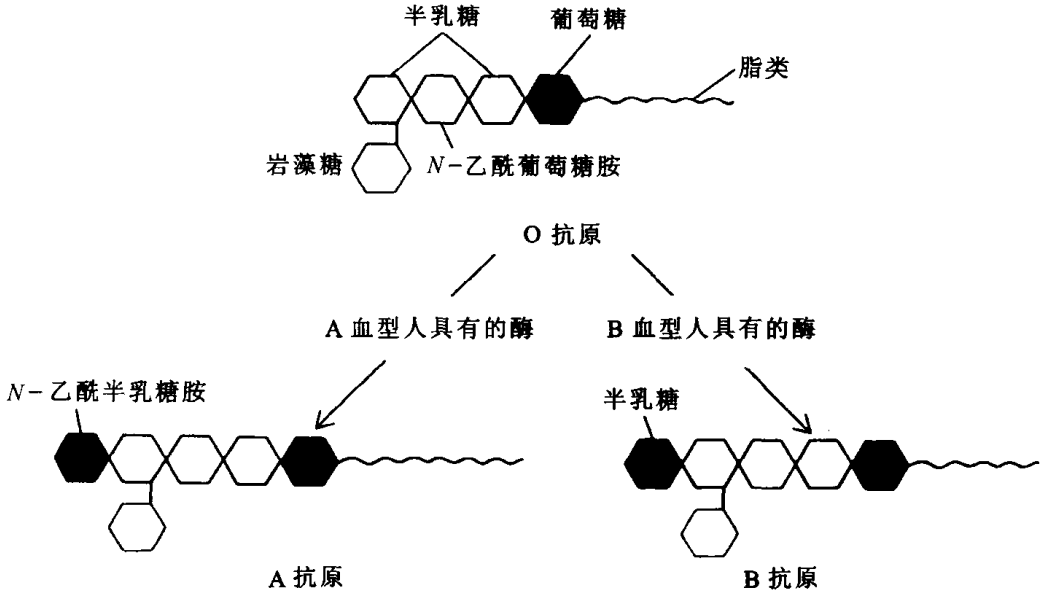


图 3 - 26 人血型抗原的结构

A 抗原和 B 抗原的差别在于特异寡糖链末端:A 抗原为 *N* - 乙酰半乳糖胺,B 抗原为半乳糖残基,O 抗原则没有 *N* - 乙酰半乳糖胺及半乳糖(仿 T. Feizi)

MN 血型抗原,是人的第二个主要血型系统,也是由遗传决定的。每一个体可以是纯合的 MM 或 NN,或者是杂合的 MN。抗原决定簇是膜的糖蛋白 - 血型糖蛋白分子的寡糖部分,血型糖蛋白的蛋白部分是单次跨膜蛋白(图 3 - 22A),其抗原决定簇的基本成分为唾液酸、半乳糖和 *N* - 乙酰半乳糖胺。如用唾液酸苷酶处理红细胞,去除了唾液酸,M 和 N 抗原决定簇即被破坏了。对这些抗原决定簇的化学结构了解得较少。

3.3 通过膜的物质运输

细胞膜在细胞生活中具有极为重要的作用,因为细胞与环境发生的一切联系和反应,都

必须通过膜。如细胞外的物质进入细胞或细胞内的物质排出细胞,以及激素、药物对细胞的作用,信号转换、细胞识别与免疫等,都是关系到膜的功能问题。

构成膜的脂双层内部是疏水的,几乎阻碍所有水溶性分子通过。但是细胞通过与其环境的物质交换进行生活生长和发育,各种水溶性物质必然能通过膜,如营养物质(糖、氨基酸等)的输入;代谢废物的输出;细胞内离子浓度(如 H^+、Na^+、K^+ 和 Ca^{2+})的调节。这些溶质很少像 CO_2 和 O_2 能简单扩散通过脂双层,而是大量地不能通过(图 3-27)。它们的运输是由膜运输蛋白(membrane transport protein)来完成的。运输蛋白是跨膜蛋白,它为物质运输提供各自的通路。例如,一些通路是对 Na^+ 开放,而不对 K^+ 开放;另一些是对 K^+ 而不对 Na^+ 开放;还有些是对葡萄糖而不对氨基酸等等。在膜上这成套的运输蛋白能精确地确定什么样的溶质能够通过、进出细胞或细胞器。因此每种类型的膜都有其运输蛋白自己的特征。根据不同物质通过膜的方式不同,可分为被动运输、主动运输以及内吞和外排作用 3 个途径。

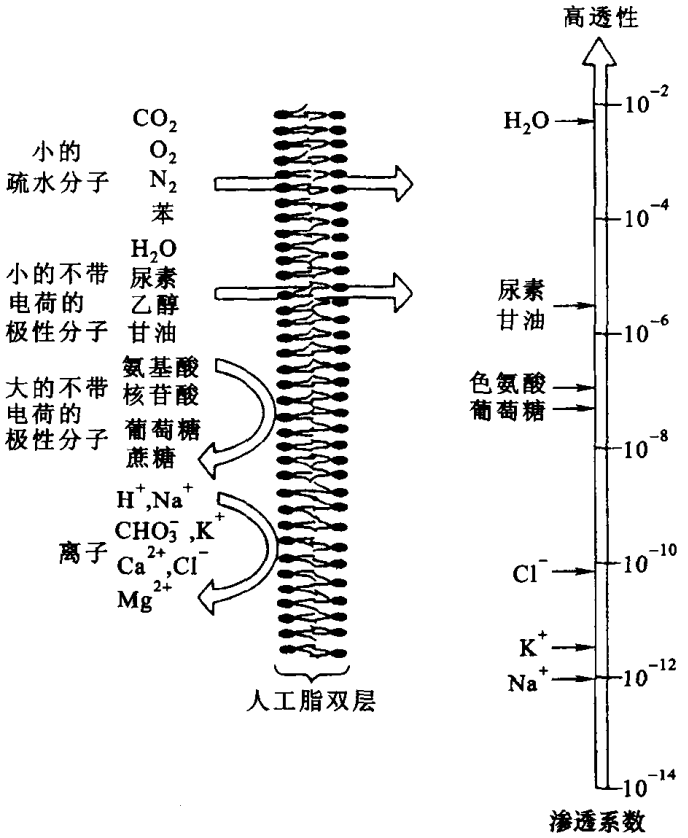


图 3-27 人工脂双层膜对不同分子的相对透性

3.3.1 被动运输

被动运输(passive transport)是指物质通过自由扩散(free diffusion)或促进扩散(facilitated diffusion),顺着浓度梯度(concentration gradient)由高浓度向低浓度运动。运动的动力来自浓度梯度,不需要由细胞提供能量(图 3-28)。参与被动运输的膜运输蛋白主要有两大类:通道蛋白和载体蛋白。此外离子载体也参与被动运输。

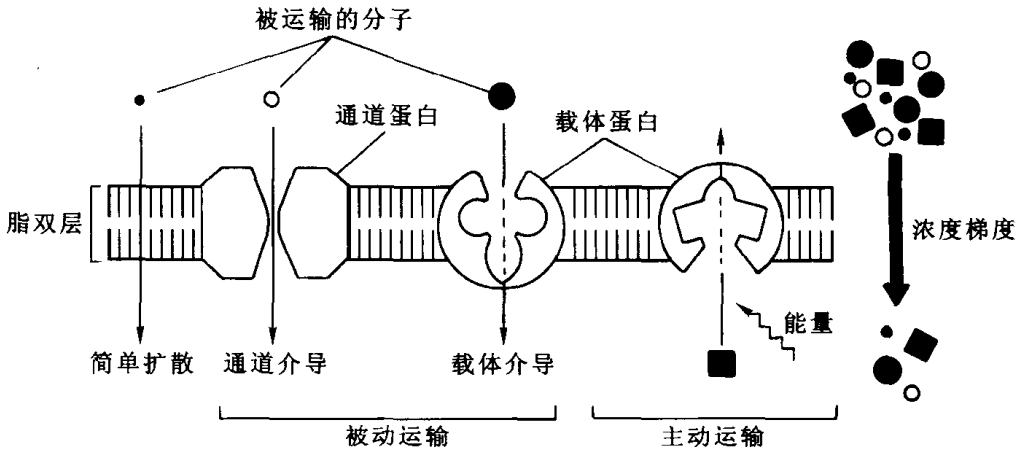


图 3－28 被动运输和主动运输比较(仿 B. Alberts, 等)

3.3.1.1 通道蛋白

通道蛋白(channel protein)是一类跨膜蛋白,具有跨膜的亲水通道,能使水、小的水溶性分子、离子等被动地通过膜。

1. 水通道或称水孔:在质膜上一部分通道蛋白带电荷的亲水区形成小的水通道,能使水及小的水溶性的溶质通过简单的自由扩散从膜的一侧到另一侧。通道蛋白不直接与小的带电荷的溶质相互作用。这些小的水溶性溶质直接经扩散作用通过水孔进出细胞。

2. 离子通道(ion channel):由于膜上的大部分通道蛋白仅能通过无机离子,故得名。在离子通道上常具有门,因此又称为门通道(gated channel)。这类通道常是由蛋白复合物构成(图 3－29)。它与简单的水孔不同,不仅有门,且对离子通过有高度的选择性,一种通道只允许一种类型的离子通过,其他的不能通过。对离子的选择性决定于离子通道的直径和形状,也决定于通道里面带电荷氨基酸的分布。例如,窄的通道不能通过大的离子;具负电荷衬里的通道,则制止了负离子的进入。离子通道与简单水孔不同,它不是连续地开放,而

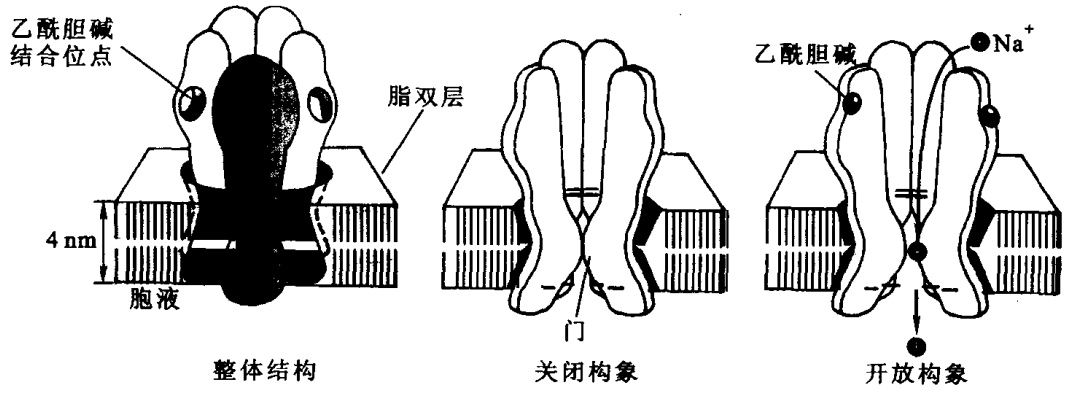


图 3－29 离子通道的结构

所示的离子通道存在于肌细胞质膜,当神经递质乙酰胆碱结合于通道时,门开放(此为递质门离子通道)。离子通道由 5 个跨膜蛋白亚单位构成。亚单位结合形成一水孔横过脂双层。这孔由 5 个跨膜的 α 螺旋为衬里,由每个亚单位提供一个带负电荷的氨基酸侧链在孔的一端,这样只有带正电荷的离子(Na^+、K^+)能通过。当通道处于关闭构象时,其孔由门的疏水氨基酸侧链关闭;当乙酰胆碱结合时,通道蛋白构象变化,此时,这些侧链移动分开,门开放,允许 Na^+、K^+ 离子通过膜(仿 B. Alberts, 等)

是瞬时地开放。一般是对其特定的刺激发生反应时,门开放,其他时间门是关闭的。门开关的转换是由于通道蛋白构象的变化。控制、影响门的开关各有其特定的条件。根据控制门开关条件的不同,大体分为以下几种类型的离子通道。

(1) 配体门通道(ligand - gated channel):细胞内外特定的物质[配体(ligand)]与相应的通道蛋白[(受体(receptor)]结合,发生反应,引起该门通道蛋白的一种成分发生构象变化,结果使门开放。离子流入门内通过膜(图 3 - 30 B、C)。例如,神经递质乙酰胆碱作用于配体门离子通道,激活了通道的离子选择性,构象变化,门打开,Na^+、Ca^{2+}离子通过膜;谷氨酸与相应的门通道结合使 Na^+、Ca^{2+}离子通过;而氨基丁酸与相应门通道结合则使 Cl^-离子通过膜。配体如为神经递质,其门通道也称为递质门通道(transmitter-gated channel)。

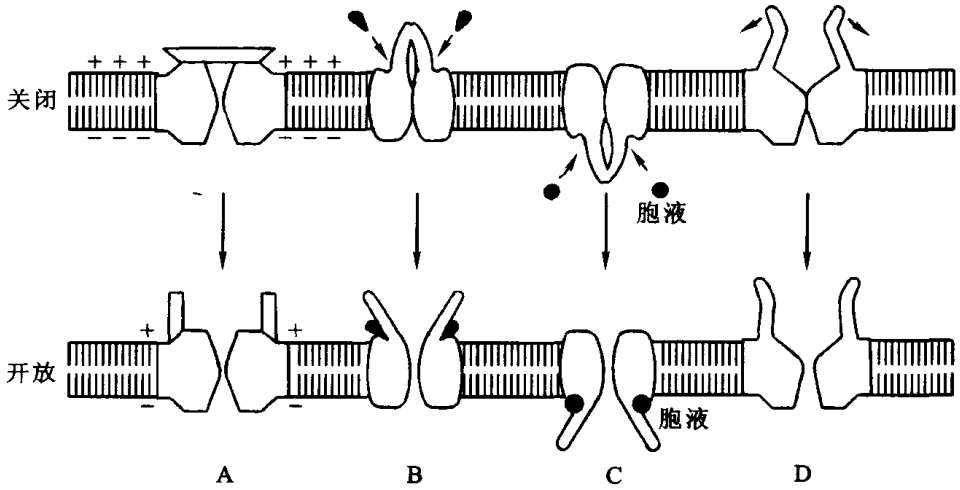


图 3 - 30　门离子通道示意图

A. 电压门,根据离子通道的类型,门开放是对膜电位变化的反应; B. 配体门,细胞外配体; C. 配体门,细胞内配体; D. 压力激活门或机械刺激门通道(仿 B. Alberts, 等)

(2) 电压门通道(voltage - gated channel):是由膜电位控制门的开关(图 3 - 30A)。在神经细胞传送电信号中起重要作用,也存在于许多其他细胞,如肌细胞、卵细胞、原生动物甚至植物细胞。它能使电信号从植物的一部分传到另一部分,如含羞草(*Mimosa*)叶子闭合反应。电压门通道有特异的电荷蛋白结构域,称为电压感受器(voltage sensor),它对膜电位的电荷变化非常敏感。当细胞内、外特异离子浓度发生变化或由其他刺激引起膜电位变化时,致使通道蛋白的构象变化,门由关闭转换为开放或者反之。例如,胞液中游离 Ca^{2+}的浓度增加时,一些 K^+的通道就打开。在很多情况下门通道有其自己的关闭机制,它能快速地自发地关闭,开放常常只有几毫秒的时间。在这短暂瞬时开放的时间里,一些离子自由扩散通过膜。门通道的开放和关闭常常是连续相继的过程。物质通过一个门通道系统进入,引起另一门通道的开放。第一个门通道的快速关闭,调整了第二个门通道系统的活动,它还可引起其他特定刺激的门通道开放,尽管原来使其开放的刺激仍存在,通道也能快速地关闭。例如,神经肌肉接头(neuromuscular junction)处,传递一个神经冲动,刺激肌肉收缩,这个简单的反应至少涉及到四五套不同的门通道有序地开放和关闭。所有这个过程不到 1 s 内完成(图 3 - 31)。

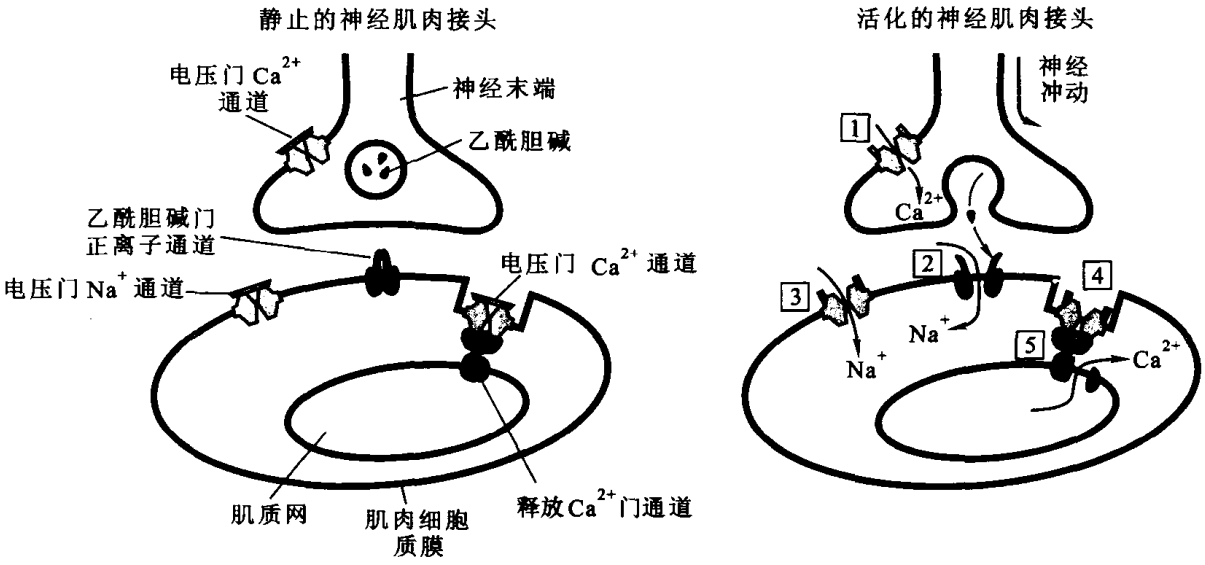


图 3－31 神经肌肉接头

说明由神经冲动刺激肌肉收缩所涉及的一些门通道，各门通道开放顺序以数字标注(仿 B. Alberts, 等)

(3) 压力激活通道(stress－activated channel)：通道门的开放是机械力量施于通道蛋白所致(图 3－30 D)。如内耳听毛细胞(auditory hair cell)质膜上具有这种类型的通道。声音震动施压力于通道，激活通道门开放，引起离子流入听毛细胞，由此建立一电信号，此信号从听毛细胞传到听神经，再由听神经传送信号到脑(图 3－32)。

迄今已发现百种以上的离子通道类型，新的类型仍在发现中。离子通道的运输效率极

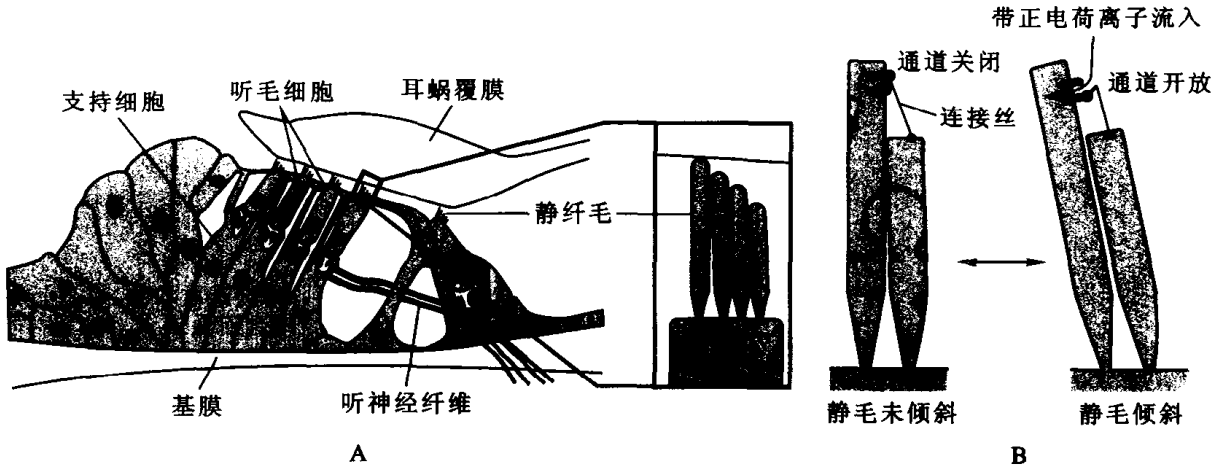


图 3－32 压力激活离子通道对听觉的作用

A. 通过柯蒂氏器(organ of Corti, 在内耳耳蜗)的切面，每一听毛细胞有一丛静纤毛(stereocilia)。听毛细胞埋在一层支持细胞中[这层细胞在基膜和耳蜗覆膜(tectorial membrane)之间]；B. 声音震动引起基膜上下震动，静纤毛倾斜，每个毛细胞上摇晃的静纤毛通过一细丝连到下一个较短的静纤毛。倾斜使这些丝伸展，它拉开了静毛膜上的压力激活的离子通道，使带正电荷离子从周围液体中进入，离子流入激活了毛细胞，它刺激下面的神经细胞传送听信号到脑。毛细胞的装置是惊人的敏感，打开一单个通道所需的力估计约为 2×10^{-13} N，我们能听到的最微弱的声音，估计能使这些丝平均伸展约 0.04 nm(不到一个 H 离子的直径)(仿 B. Alberts, 等)

高,每秒钟能有百万以上的离子通过一个通道。这比已知任一载体蛋白最大的运输速率高 1 000 倍。大部分离子通道的功能是简单的,选择的无机离子主要是 Na^+、K^+、Ca^{2+} 或 Cl^-,在通道门开放时按电化学梯度快速地扩散通过膜。这对控制膜电位、调节细胞内的离子平衡是重要的。在活细胞中已知电压门离子通道是受膜电位控制的,但是,是什么控制膜电位呢? 简单地回答是:离子通道本身控制它。这是一个控制环(control loop),从离子通道→膜电位→离子通道,对细胞中所有的电信号都是基本的、重要的。

神经突触连接使人能思考、动作和记忆。在化学突触上,突触前神经细胞末端转变电信号为化学信号,突触后的细胞转变化学信号为电信号(图 3－33)。表面上看似乎是无效地

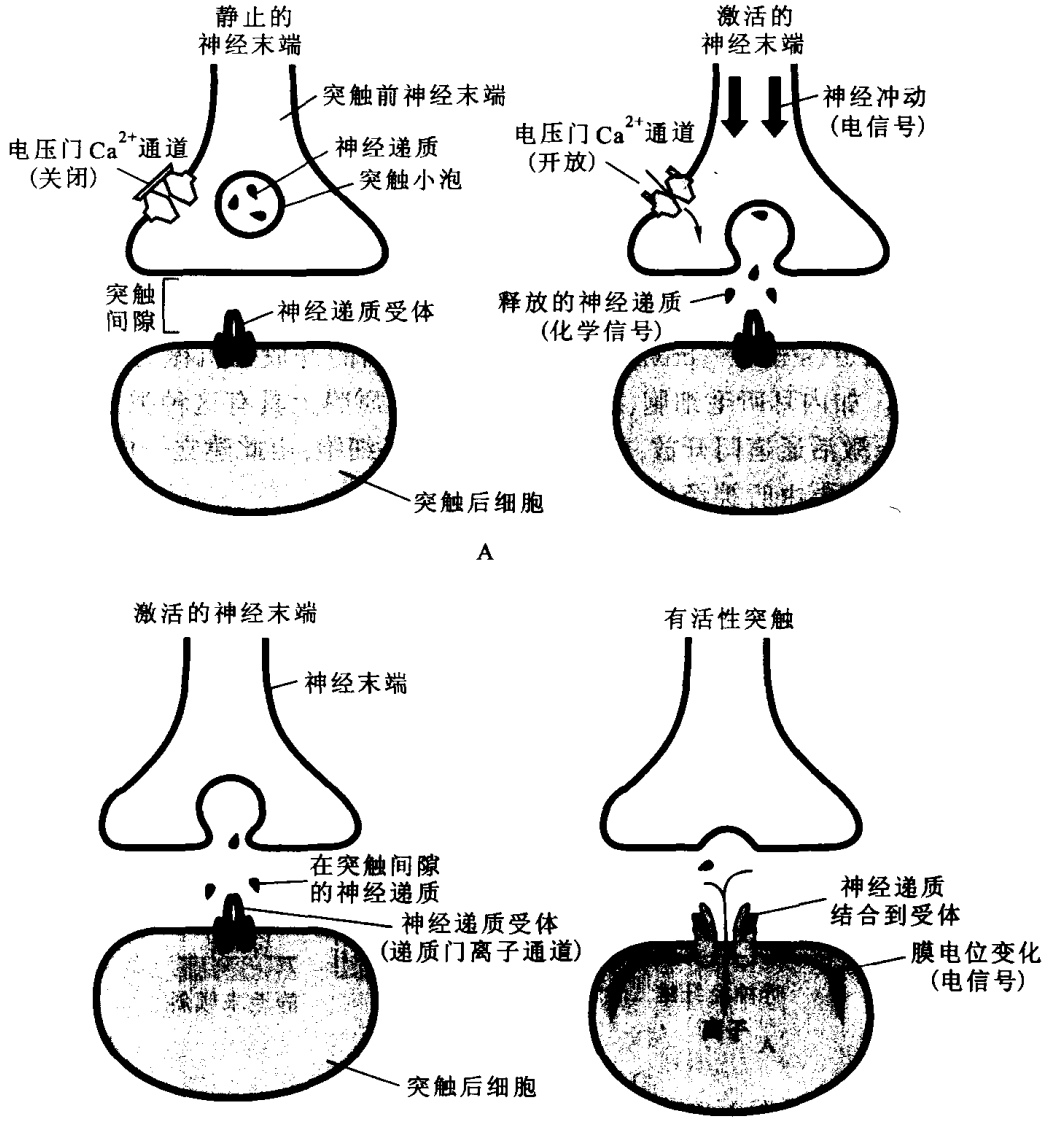


图 3－33　在神经细胞末端电信号与化学信号的转变

A. 神经末端转变电信号为化学信号,当一动作电位达到神经末端时,打开了质膜上的电压门 Ca^{2+} 通道,使 Ca^{2+} 流入末端,Ca^{2+} 增加刺激突触小泡与质膜融合,释放神经递质到突触间隙; B. 通过突触上的递质门离子通道转变化学信号为电信号,释放的神经递质结合到突触后细胞质膜上的递质门离子通道,门打开,结果离子流改变了突触后细胞的膜电位由此转变化学信号为电信号(仿 B. Alberts, 等)

转变电信号，实际上，神经系统是一个庞大的神经网络，由极多的分支通路相互连接形成复杂的程序分析系列。例如，脊髓的一个运动神经元接受几百几千个其他神经的输入。从输入的多路感应中计算出适宜的输出（刺激肌肉反应或保持静止），是通过神经元质膜上不同类型的离子通道复杂的相互作用完成的。在人脑中有几百种类型的神经元，每个都有它成套的离子通道和受体，使其对某些输入信号发生反应，完成其专门的工作。突触上的离子通道和其他成分，按其用处经受稳定持久的修饰，这样才保持了过去一些事情的踪迹，以此贮存记忆。因此，离子通道对人的动作、思考、感觉、说话、记忆等具有核心的重要作用。

3.3.1.2 载体蛋白

载体蛋白（carrier protein）是参与被动运输的另一类运输蛋白，也是跨膜蛋白分子，能与特定的分子如一些小的有机分子（如糖、氨基酸、核苷酸）或金属离子等结合通过膜。这种物质运输称为促进扩散，也称为易化扩散或协助扩散。载体有高度的选择性，其上有结合点，只能与某一种物质进行暂时性、可逆的结合和分离，而且一种特定的载体只运输一种类型的化合物，甚至仅一种分子或离子。将物质从膜的一侧运输至另一侧，不需要 ATP 提供能量，而是顺着浓度梯度进行促进扩散运输（图 3－34）。例如，哺乳动物肝细胞（许多其他类型细胞）质膜上的葡萄糖载体（glucose carrier），是由横过膜至少 12 次的蛋白链组成，这种蛋白有两种构象：一种是载体的葡萄糖结合点向细胞膜的外侧，另一构象是结合点向细胞膜内侧。当葡萄糖在肝细胞外浓度高时（饭后），葡萄糖分子结合到载体的结合点，载体蛋白构象转换，携带这些分子向内并释放于胞液中（这里葡萄糖浓度低）；当血糖浓度低时（饥饿），激素、胰高血糖素（glucagon）刺激肝细胞使糖元分解成大量的葡萄糖，结果葡萄糖的浓度在细胞内比细胞外高。葡萄糖结合到载体蛋白，转变构象，将葡萄糖输出细胞外。根据浓度梯度，葡萄糖通过膜可向细胞内、外两个方向运输。载体蛋白能使溶质流动，但不能决定其方向。葡萄糖是不带电荷的分子，被动运输的方向简单地决定于浓度梯度。

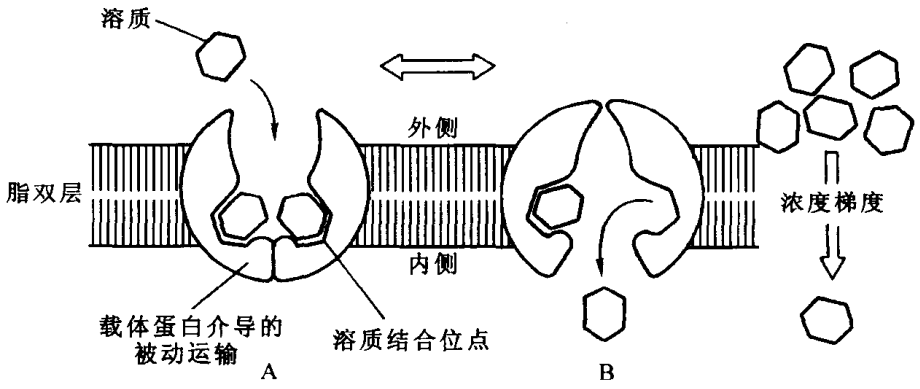


图 3－34 载体蛋白构象变化介导溶质（如葡萄糖）的被动运输示意图

载体蛋白以两种构象存在：A. 溶质的结合点露在膜的外侧；B. 相同的结合点露在膜的另一侧，这两种构象的变化是随机的、可逆的。如果在膜外侧的溶质浓度高，则 A 结合溶质转为 B 构象，携带溶质进入细胞；反之，如果膜内侧的浓度高，则 B 结合溶质转向 A，将溶质输出细胞（仿 B. Alberts, 等）

如果溶质是带电荷的分子或小的有机离子、无机离子等，经被动运输通过膜，除了浓度梯度的力量作用外，还有一种附加的力起作用。已知大部分细胞膜横过膜有一电位差，即在

膜的每一边电势不同,这被称之为膜电位(membrane potential),它对任何带电荷的分子通过膜都行使一种力。比如,在质膜的胞质面常常是负电位,这吸引带正电荷离子的溶质进入细胞,并驱动带负电荷的在外边;同时带电荷的溶质也倾向于按浓度梯度下行运动。

可见驱动带电荷的溶质通过膜是由 2 个力合成的:一个是浓度梯度,另一个是膜电位,这种对某种溶质的驱动力称为电化学梯度(electrochemical gradient)。它就是决定被动运输溶质通过膜方向的梯度。对一些离子,电位差和浓度梯度以相同的方向工作,产生一急剧增大的电化学梯度(图 3-35 B),如 Na^+ 带正电荷,在细胞外比细胞内浓度高,因此 Na^+ 易于进入细胞;如果电位差和浓度梯度是相反的作用,结果电化学梯度会是小的(图 3-35 C)。

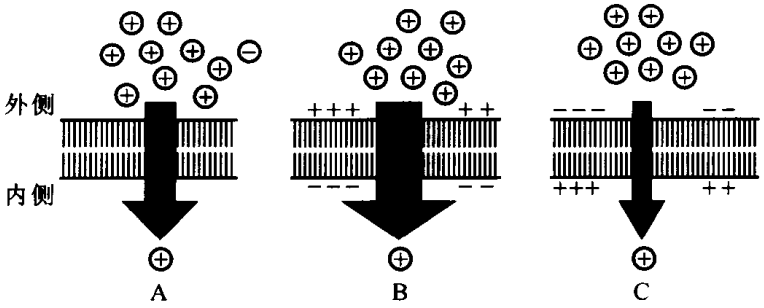


图 3-35 电化学梯度使带电荷的溶质通过膜是溶质的浓度梯度和横过膜的电位差(膜电位)的总和

箭头代表在 3 种不同情况下,对同一种带正电荷溶质电化学梯度的大小。A. 无膜电位,仅有浓度梯度;B. 有膜电位,负电荷在内侧,浓度梯度由膜电位补充加强以致增加了驱动力;C. 有膜电位,正电荷在内侧,膜电位减低了由浓度梯度产生的驱动力(仿 B. Alberts, 等)

3.3.1.3 离子载体

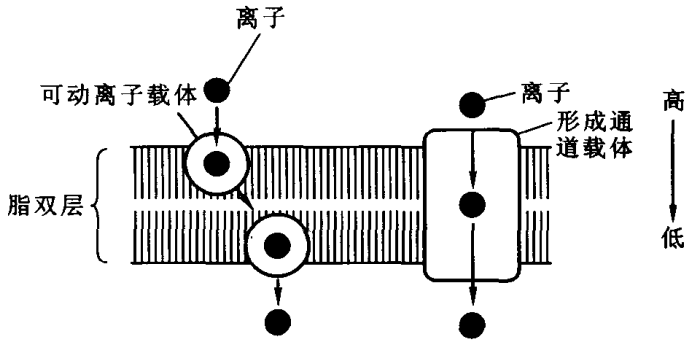
离子载体(ionophore)也是按被动运输的途径运输离子,但是它不同于运输蛋白。离子载体是小的疏水分子,溶于膜的脂双层中,大部分是微生物合成的,它能保护带电荷的离子顺着电化学梯度通过脂双层。离子载体已被广泛用于对人工合成膜、细胞器以及完整细胞增加膜离子透性的研究,有些已被用作为抗生素。有两类离子载体:可动离子载体(mobile ion carrier)和形成通道载体(channel forming carrier)(图 3-36 A)。

缬氨霉素(valinomycin)属于可动离子载体。它是一个环形的聚合物。该环有一疏水的外面(由缬氨酸侧链构成)与脂双层的疏水部分接触,其极性的内部能精确地固定单个的 K^+(图 3-36 B)。缬氨霉素在膜的一侧结合 K^+,顺着电化学梯度通过脂双层,在膜的另一侧释放 K^+,且能往返进行,以此增加膜对 K^+ 的透性。

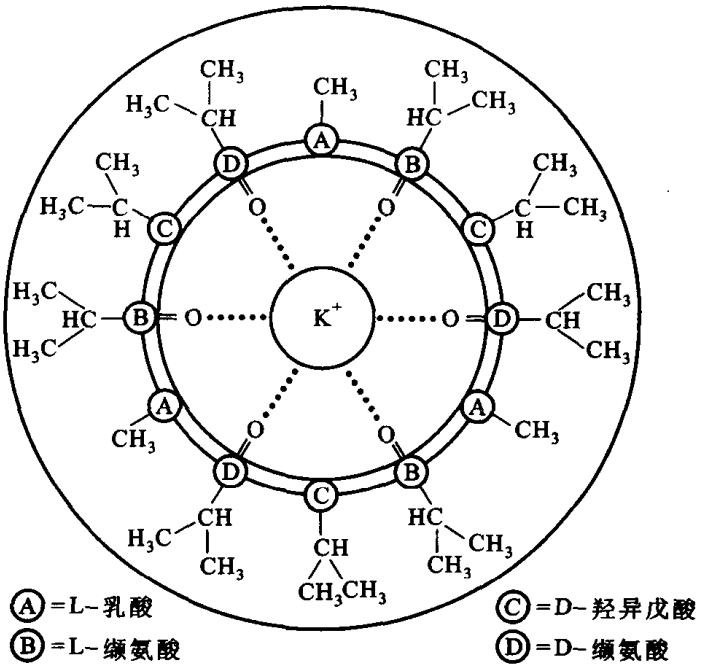
离子载体 A23187,也是一种可动离子载体,它是运输 2 价阳离子如 Ca^{2+}、Mg^{2+}。这种离子载体起离子交换作用。携带一个 2 价的阳离子进入细胞,就携带 2 个 H^+ 出细胞。该离子载体已被用于细胞生物学研究,以增加胞液中自由 Ca^{2+} 的浓度。在温度降低至凝固点以下时,可动载体不能扩散通过脂双层,便停止运输;而形成通道载体则能正常运输离子。由此可鉴别这两种离子载体。

短杆菌肽 A(gramicidin A)是一种形成通道载体,由 15 个氨基酸形成,具疏水的侧链。一般认为它由 2 个分子端对端在一起形成一跨膜通道(图 3-36 C),有选择地使单价阳离

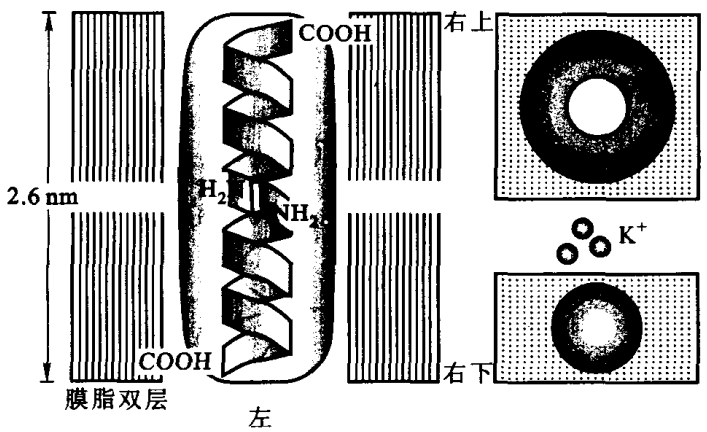
子按电化学梯度通过膜。这种二聚体不稳定，不断地形成又分离。对一个通道平均开放的时间约为 1 s。在电化学梯度很大时，短杆菌肽 A 在每毫秒内每个开放通道能运输约 2 万个阳离子，这比可动离子载体所运输的约多 1 000 倍。短杆菌肽 A 是由某些细菌合成的，已被用作为抗菌素。



A



B



C

图 3－36 离子载体

A. 离子载体分为两种类型：可动离子载体和形成通道载体；B. 缬氨霉素为一环形聚合体；C. 短杆菌肽 A 通道是由两个相同的肽链在其氨基端相结合形成，每个主链折叠成 β 螺旋，像是卷起的 β 片，侧链疏水与脂双层接触：(左)侧面观，(右上)上面观，可见中间有孔，其下示未水化的 K^+ 的大小，(右下)为一跨膜的 α 螺旋上面观，与 β 片比较它没有孔，不能形成通道(A、B 仿 C.J.Avers)

3.3.2 主动运输

主动运输(active transport)与被动运输不同,在主动运输过程中,物质逆着浓度梯度或电化学梯度由低向高浓度运输,在此过程中需要供给能量。主动运输对保持细胞内的离子成分并对输入一些在细胞外比细胞内浓度低的溶质是必不可少的。如一般动、植物细胞能大量地累积 K^+(个别的累积 Na^+),典型的哺乳动物细胞内 K^+ 的浓度约为 100～400 mmol/L,而在细胞外仅约为 5mmol/L;Na^+ 的浓度在细胞外约为 150 mmol/L,细胞内约为 5～20 mmol/L;Ca^{2+} 的浓度差异更大,典型的胞液内浓度约为 10^{-7}mol/L,而细胞外的比它大 1 000～10 000 倍。又如,细胞内氨基酸的含量可能高出细胞外 10 倍以上等等。无数事实说明,细胞膜具有主动运输的能力及其重要性。细胞进行主动运输有 3 种主要方式:①ATP－驱动泵(ATP－driven pump);②协同运输器(co-transporter)和③光驱动泵(light－driven pump)(图 3－37)。

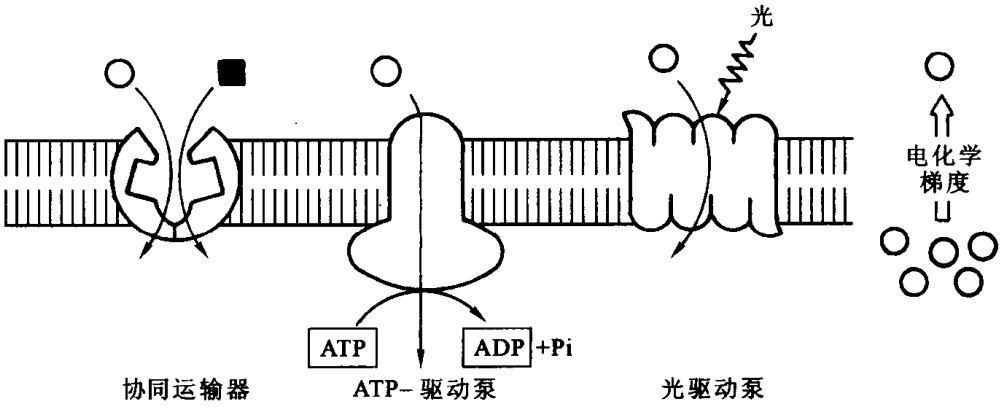


图 3－37　主动运输的 3 种主要方式(仿 B. Alberts, 等)

3.3.2.1 ATP－驱动泵

这类泵本身是一种载体蛋白,也是一种酶——ATP 酶。它能催化 ATP,由 ATP 水解提供能量,主动运输 Na^+、K^+、Ca^{2+} 等,由于运输溶质不同,而分为钠钾泵和钙泵等等。

1. $Na^+－K^+$ 泵($Na^+－K^+$ pump)或称钠钾交换泵(Na^+/K^+ exchange pump)或简称为钠泵:在动物细胞膜上存在有大量的 $Na^+－K^+$ 泵,它可将细胞内的 Na^+ 泵出细胞外,在泵出 Na^+ 的同时又将细胞外的 K^+ 泵入细胞内。$Na^+－K^+$ 泵就是 $Na^+－K^+$ ATP 酶。这种 $Na^+－K^+$ ATP 酶已被纯化,并发现它是由 2 个亚单位构成:1 个大的多次跨膜的催化亚单位(约 1 000 个氨基酸长)和 1 个小的单次跨膜具组织特异性的糖蛋白。前者对 Na^+ 和 ATP 结合的位点在细胞质面,对 K^+ 的结合位点在膜的外表面(图 3－38),糖蛋白的功能尚不确定。在泵入泵出的周期中,

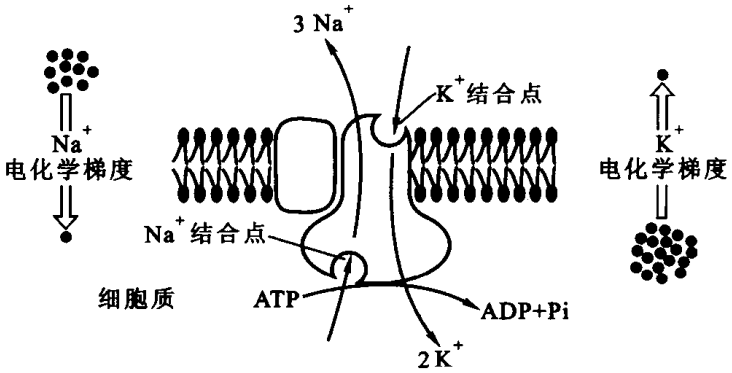


图 3－38　$Na^+－K^+$ 泵示意图(仿 B. Alberts, 等)

进行可逆的磷酸化和去磷酸化，比如，在膜内侧的 Na^+ 与酶结合激活了 ATP 酶活性，使 ATP 水解，释放出高能磷酸基团与酶(泵)结合(磷酸基团转移到天冬酰胺残基上)，酶的磷酸化引起酶的构象变化，于是与 Na^+ 结合的位点转向膜的外侧，这种磷酸化的酶对 Na^+ 的亲和力低，对 K^+ 的亲和力高，因而在膜外侧释放 Na^+，而与 K^+ 结合。K^+ 与酶结合后促进酶去磷酸化，结果酶的构象又恢复原状，与 K^+ 结合的位点转向膜内侧，这种去磷酸化的构象与 K^+ 的亲和力低，与 Na^+ 的亲和力高，于是在膜内侧释放 K^+，而又与 Na^+ 结合(图 3－39)。其总反应式：

$$ATP + E(ATP\ 酶) \xrightarrow{Na^+(或\ Mg^{2+})} E\sim P(=O)(OH)-OH + ADP$$

$$ADP + E\sim P(=O)(OH)-OH + H_2O \xrightarrow{K^+} E + H_3PO_4$$

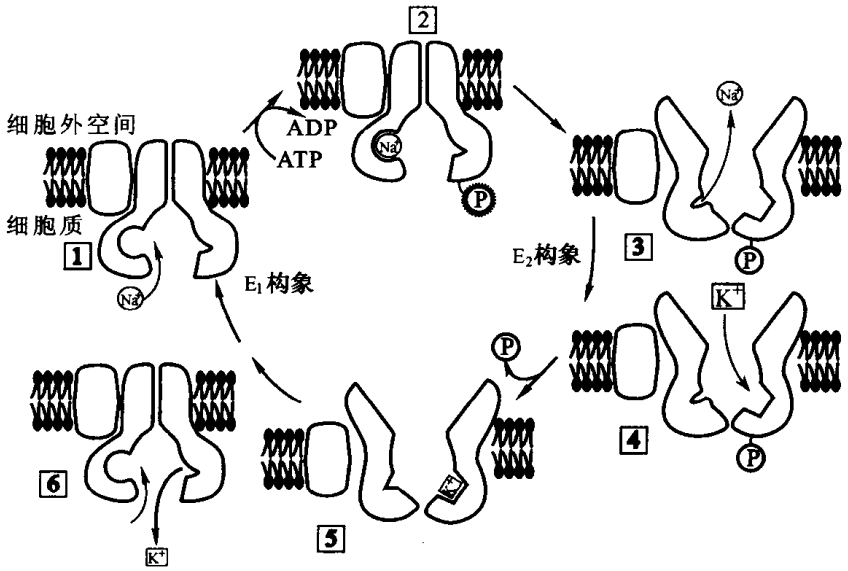


图 3－39 图示 $Na^+ - K^+$ 泵运输 Na^+ 出细胞，运输 K^+ 进入细胞的过程(1～6)
实验表明，每个 ATP 分子水解可泵出 3 个 Na^+，泵入 2 个 K^+(仿 B. Alberts, 等)

如此反复进行，整个周期约需 10 ms。在周期中每一步骤都决定于前一个步骤。如果有一个步骤受到阻碍，泵的功能就停止了。这种紧密的偶联使得泵只在有适宜离子存在时才进行运输，由此避免了 ATP 无效地水解。应用乌本苷(ouabain)以及抑制生物氧化的药物都能抑制 Na^+ 泵，乌本苷的作用是由于它能与 $Na^+ - K^+$ ATP 酶结合，影响 K^+ 与 ATP 酶特异结合点结合，使 Na^+ 泵失去作用。生物氧化剂如氰化物使 ATP 供应中断，Na^+ 泵失去能源以致停止工作。

现在已能将膜的 $Na^+ - K^+$ ATP 酶纯化，并重建具有 $Na^+ - K^+$ 泵功能的人工膜。

$Na^+ - K^+$ 泵对维持离子梯度具有重要的生理意义，它不仅维持细胞的膜电位或为可兴

奋细胞(如神经肌肉细胞等)的活动基础,也调节细胞体积、维持细胞的渗透平衡,以及驱动细胞营养物(如糖、氨基酸等)的运输。

2. Ca^{2+} 泵(Ca^{2+}-pump):是 Ca^{2+} ATP 酶,它能将 Ca^{2+} 泵出细胞,使 Ca^{2+} 浓度在细胞质中维持低水平。有些细胞如红细胞位于质膜的 Ca^{2+} 泵,将 Ca^{2+} 运输出细胞。在肌细胞肌质网膜内,Ca^{2+} 泵运输 Ca^{2+} 从细胞质到肌质网内,在肌质网内贮存 Ca^{2+},从肌质网释放 Ca^{2+} 到肌细胞液中引起收缩,通过 Ca^{2+} ATP 酶快速地去除 Ca^{2+} 使其得以弛缓。Ca^{2+} 泵的运输机制类似于 $Na^+ - K^+$ 泵,每 1 个 ATP 分子水解,运输 2 个 Ca^{2+},并可逆向运输 1 个 Mg^{2+} 离子。

$Na^+ - K^+$ 泵和 Ca^{2+} 泵均属 P 型的离子泵,'P'是磷酸化的意思,指在泵的周期中 ATP 水解导致磷酸基团转移到运输蛋白(泵)的一个氨基酸上,它依次引起该运输蛋白的构象变化,由于这种构象变化,被运输的两种离子与蛋白亲和性的改变将离子运输到膜内外。

3.3.2.2　协同运输(co-transport)

动物细胞对葡萄糖和氨基酸的主动运输,不直接用 ATP 水解的能,而是由于膜上的 $Na^+ - K^+$ 泵排出的 Na^+ 所产生的电化学梯度使物质进入细胞。这一过程,被认为膜上的 $Na^+ - K^+$ 泵和载体蛋白共同协作。载体蛋白有 2 个结合位点,可分别与 Na^+、糖(或氨基酸等)结合。Na^+ 泵需 ATP 提供能量不断地将 Na^+ 泵出细胞外,结果造成细胞外的 Na^+ 高于

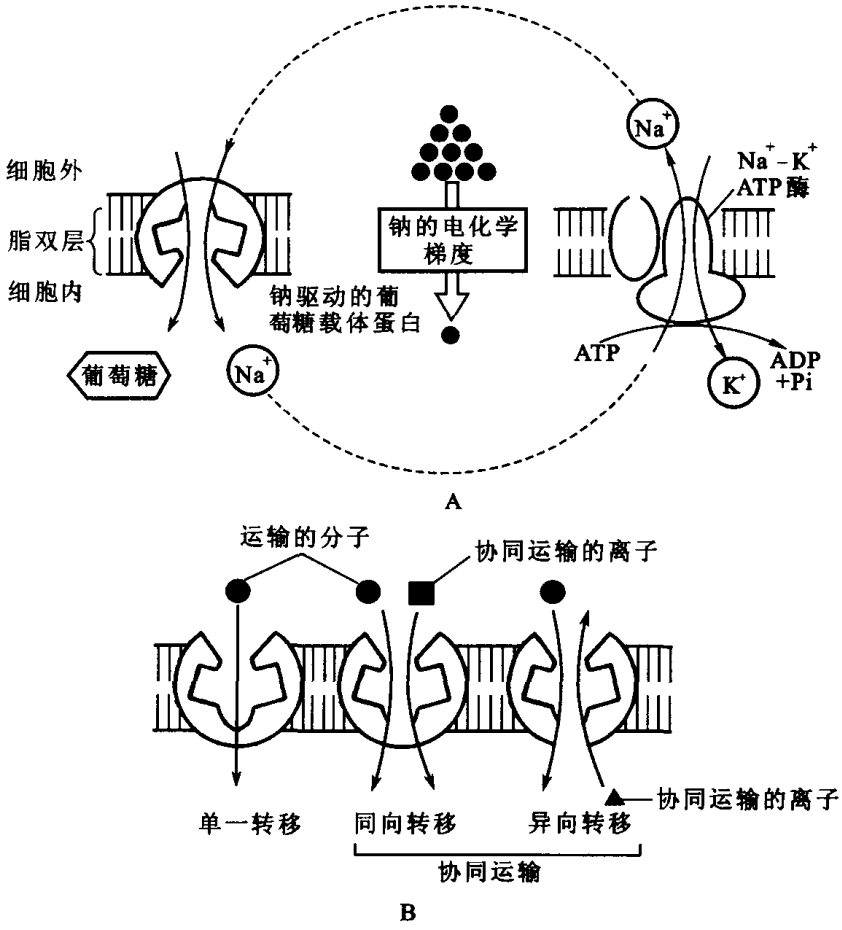


图 3-40　协同运输示意图

A. $Na^+ - K^+$ 泵和载体协同运输; B. 协同运输的同向转移和异向转移

细胞内的，由此产生了电化学梯度。Na^+和糖分别与载体蛋白的不同位点结合，借电化学梯度使Na^+和糖相伴进入膜内侧，再与载体蛋白脱离，Na^+又被Na^+-K^+泵排出细胞，载体蛋白又恢复原样反复工作(图 3-40 A)。由于糖和Na^+相伴运输，因此也称为伴随运输。这种载体蛋白被称为协同运输器(co-transporter)，也称为偶联运输器(coupled transporter)。一般认为小肠上皮细胞吸收葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖以及各种氨基酸，是通过这种途径逆着浓度梯度向细胞内运输的。因为发现在这种过程进行时，周围介质中需有高浓度的Na^+，否则葡萄糖和氨基酸的运输就不能进行；同时也发现Na^+伴随葡萄糖或氨基酸等进入细胞。

协同运输有同向转移(symport)和异向转移(antiport)(图 3-40 B)。动物细胞协同运输的离子通常是Na^+。葡萄糖进入小肠和肾细胞是通过同向转移系统。许多动物细胞质膜已知至少有 5 种不同的氨基酸载体蛋白。每一特定的载体蛋白结合一组关系相近的氨基酸，与Na^+进行同向转移。但是，Na^+的梯度也能驱动异向转移系统。例如，在动物细胞膜上有Na^+/H^+交换载体，进行异向转移，即伴随Na^+进入细胞而将H^+输出细胞，以调节细胞内的 pH 值。

在植物细胞、真菌和许多细菌的质膜上没有Na^+-K^+泵而有H^+泵，H^+泵是H^+-ATP 酶。由H^+泵用 ATP 水解的能量，将H^+泵出细胞，使细胞外的H^+浓度高于细胞内，由此建立起H^+电化学梯度，通过H^+的同向转移将糖和氨基酸等带入细胞内。这与Na^+-K^+泵很相似，只是H^+泵产生H^+的电化学梯度驱动溶质运输入细胞。

在细胞内的一些细胞器的膜，发现有不同类型的H^+泵。这种泵属 V 型泵，它利用 ATP 的能量，而不形成磷酸化的蛋白中间物，主动运输H^+横过一些细胞器的膜。如动物细胞的溶酶体和植物、真菌细胞的中央液泡膜的H^+泵，是泵H^+从胞液进入细胞器，这有助于维持胞液 pH 中性和细胞器内 pH 酸性，酸性环境对许多细胞器行使其功能是必不可少的条件。

3.3.2.3 光驱动泵

在一些光合成细菌膜上的H^+泵，是由光激活H^+泵的活性，产生H^+电化学梯度，驱动溶质进入细胞。

3.3.3 内吞作用和外排作用

上述的被动运输和主动运输均是由运输蛋白介导的小分子和离子的运输。内吞作用(endocytosis 或称胞吞)和外排作用(exocytosis 或称胞吐)则能运输大分子(如蛋白质、多核苷酸和多糖等)通过膜。细胞摄入和排出大分子通过质膜，主要由囊泡运输来完成。当细胞摄取大分子时，首先被摄入物附于细胞表面，该处质膜凹陷分离下来，形成小囊泡(vesicle)落入细胞内，这一过程称为内吞作用(图 3-41)。

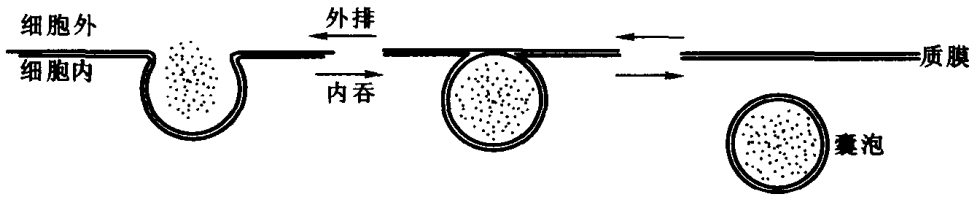


图 3-41 内吞作用和外排作用示意图

与内吞作用的顺序相反,有些大分子通过形成小囊泡从细胞内部移至细胞表面,小囊泡的膜与质膜融合,将物质排出细胞外,这个过程称为外排作用(图 3-41)。如细胞内合成的分泌蛋白就是通过这种过程排出的。内吞作用和外排作用均属于主动运输,因为它们需要细胞提供能量。如果磷酸化被抑制,肺泡巨噬细胞的吞噬作用就受到阻碍。内吞与外排作用的重要特征是细胞摄入的或分泌的大分子被收入到小囊泡中,每个小囊泡只与特定的膜融合,且有顺序地转移。小囊泡快速地大规模地形成、转移、融合,是真核细胞基本特征之一。

根据形成小囊泡的大小和内容物可分为两种类型:内吞的物质如为固体物、形成的囊泡较大(一般直径>250 nm)则称为吞噬作用(phagocytosis);若为液体或溶质、形成的囊泡较小(一般直径<150 nm),则称为胞饮作用(pinocytosis)。细胞常通过胞饮作用连续地摄入液体和溶质,而大的颗粒主要由一些特化的吞噬细胞进行吞噬,但不是吞噬所有附着的颗粒。在吞噬细胞表面有种种与吞噬机制相关的表面受体,吞噬作用是一个触发的过程(triggered process),即由被吞噬物激活表面受体,传递信号到细胞内部,发生反应;而胞饮作用是一个连续发生的过程。

吞噬作用在原生动物是取食的一种方式,而在多细胞有机体,仅在一些特化细胞能够摄入大颗粒。在动物的消化管内,被摄入的食物经细胞外消化酶分解为小分子,然后通过消化管上皮吸收细胞摄入。吞噬作用,在大部分动物,其重要性不是营养而是防卫。如巨噬细胞、白细胞等吞噬细胞,其质膜的表面受体,有些能识别抗体。抗体蛋白结合到细菌等微生物的表面,保护机体免受感染。结合抗体被的细菌(anti-coated bacteria),由抗体与受体结合,引起吞噬细胞质膜伸展,形成伪足,吞噬细菌。

3.3.3.1 受体介导的内吞作用

大部分动物细胞通过受体介导的内吞作用,使一些特定的大分子进入细胞。在受体介导过程中,一些特定的大分子结合到细胞表面受体(cell surface receptor),这些受体所处的质膜部位的胞质面,聚集多个蛋白形成的蛋白被(protein coat),由于蛋白被组装的作用,该处质膜凹陷称为有被小窝(coated pits),有被小窝进一步凹陷,从膜上脱落下来形成有被小囊(coated vesicles)(图 3-42)。这一过程的速度很快,能使细胞大量地摄入特定的大分子,又避免了吸入大量的细胞外液体。其效率比一般的胞饮作用约大 1 000 倍。甚至在细胞外液中有较少的可吸入物也能大量摄入而不带入大量的细胞外液体。这是一种选择浓缩的机制(selective concentrating mechanism)。

通过受体介导的内吞作用可使许多种物质包括许多基本代谢物如维生素 B_{12}、铁[通过传铁蛋白(transferrin)]、胆固醇、一些激素、一些酶以及一些病毒(包括流感病毒和艾滋病病毒等)进入细胞。其中一个重要的被人熟知的例子是,动物细胞摄入其用于新膜合成所需的胆固醇。

胆固醇与低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)结合成球形小颗粒(其中大的颗粒直径约 22 nm)在血液中运输。LDL 颗粒(LDL-胆固醇)能特异地与质膜的 LDL 受体蛋白结合。当动物细胞需要胆固醇进行细胞膜合成或其他代谢需要(如合成类固醇激素)时,它就产生 LDL 受体蛋白并插入于质膜内。这些受体蛋白能自发地与有被小窝结合。LDL 颗粒与 LDL 受体结合,内化被摄入细胞内成为有被小囊。然后很快地脱去包被并与称为胞

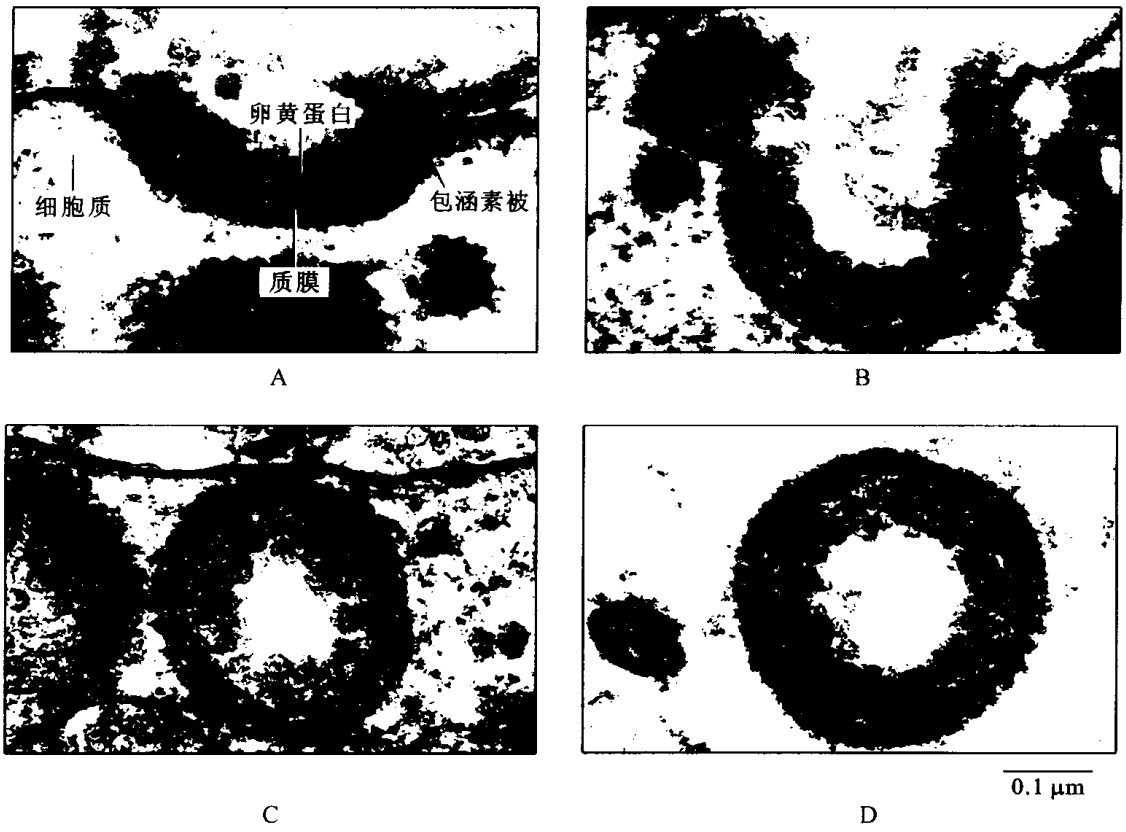


图 3－42 鸡卵母细胞中脂蛋白颗粒经受体介导的内吞作用摄入以形成卵黄的电镜照片
A～D 示从有被小窝,脂蛋白颗粒结合到受体,有被小窝凹陷形成有被小囊的顺序。在胞质面有被小窝的包被成为有被小囊的包被(引自 M. M. Perry, A. B. Gilbert)

内体(endosome)的小囊融合。在胞内体较酸性的环境中,受体构象发生变化,LDL 颗粒与其受体分离,它们分到不同的小囊中。含有 LDL 颗粒的小囊与初级溶酶体融合,形成次级溶酶体。在溶酶体内,胆固醇酯被水解成游离的胆固醇分子,释放于胞液中,成为新膜合成或其他代谢可利用的分子。而 LDL 受体蛋白被循环又返回到质膜,插入于有被小窝,准备再结合其他的 LDL 颗粒(图 3－43)。如果在一个细胞内累积的游离胆固醇过多,细胞就停止了自己胆固醇合成以及 LDL 受体的合成。在遗传上具有编码 LDL 受体蛋白基因缺陷的个体,有的是受体丢失,有的受体虽存在但无功能,因此,他们的细胞不能摄入 LDL 颗粒,致使胆固醇在血液中累积,高水平的血胆固醇诱发动脉粥样硬化,导致冠心病以致早年死亡。

在血液中,运输胆固醇不仅有 LDL,还有高密度脂蛋白(high－density lipoprotein, HDL),它有相似的结构,但含有不同的蛋白,有不同的生理作用。LDL 主要是携带胆固醇从肝(在肝内包装)通过血流到身体细胞。HDL 以相反方向携带胆固醇从身体细胞到肝脏,在肝中通过内吞作用并作为胆汁的部分被排出。HDL 这样通过肝促进了血胆固醇的清除。

经实验研究,对受体介导的内吞过程中一些重要阶段,现已有较为深入的认识:

1. 有被小窝和有被小囊:构成其包被的蛋白质主要是包涵蛋白或称包涵素(clathrin),是目前了解较清楚的包被蛋白,它是一种纤维蛋白与另一种较小的多肽形成了包被的结构单位——三叉辐射型单体(triskelion,或称三腿蛋白复合物),由它聚合成网格状结构覆于有

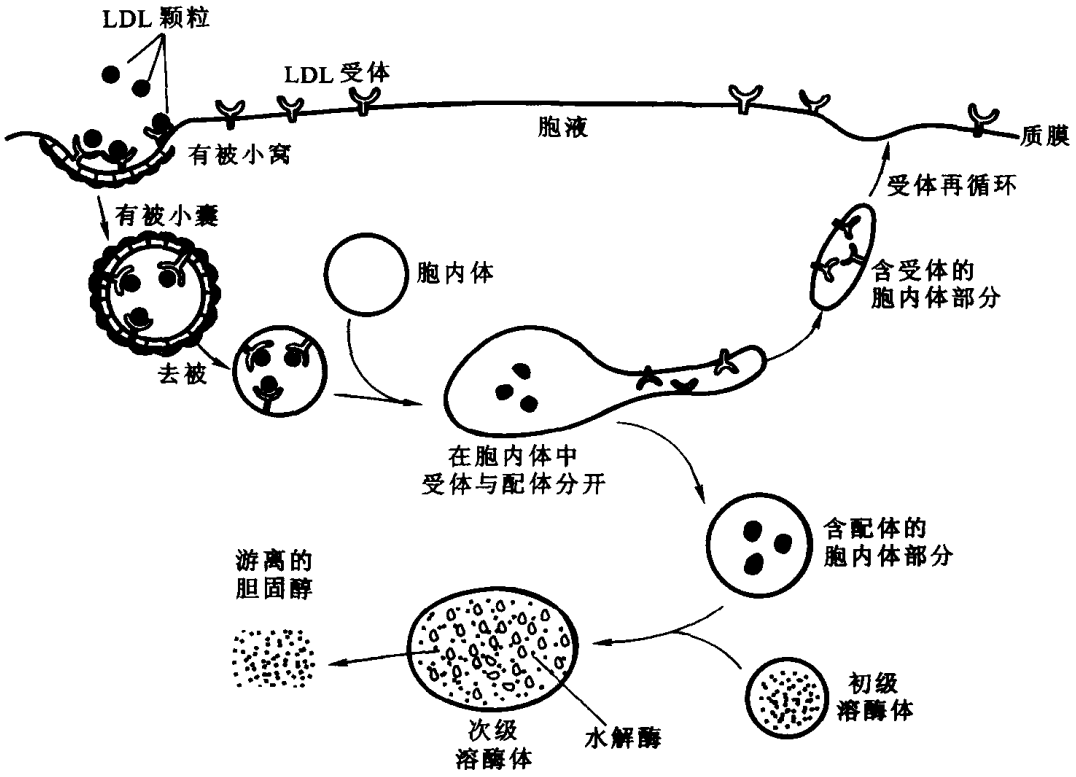
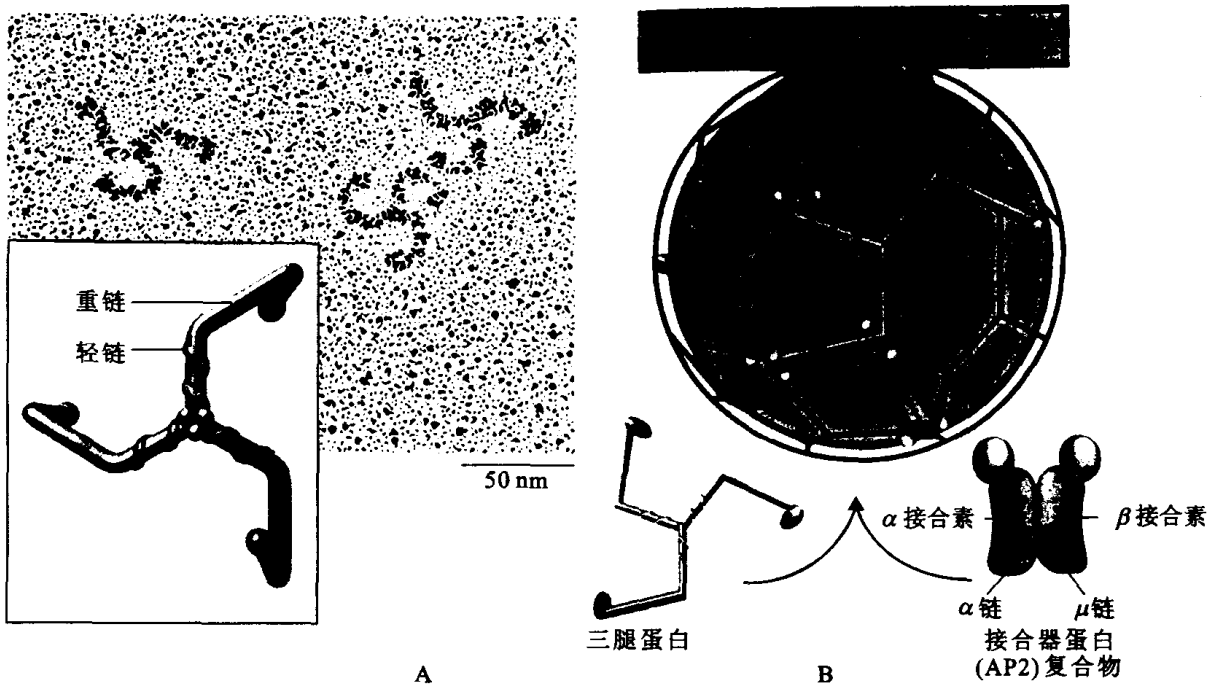


图 3－43　LDL 颗粒受体介导的内吞作用

A. 从 LDL 颗粒与其受体结合到游离胆固醇分子的释放以及受体循环的过程；B. LDL 颗粒，每一个 LDL 颗粒包含约 1 500 个酯化到长链脂肪酸的胆固醇分子为核心，外面包围着一单层含有磷脂、未酯化的胆固醇和一种单拷贝的大蛋白质(apolipoprotein B-100)，它能特异地与细胞表面的 LDL 受体结合(B 自 G. Karp, 1999)

被小窝的胞质面和有被小囊的表面(图 3－44)。一般认为，在内吞途径的质膜出芽(形成小窝)和向外分泌途径的高尔基器膜出芽，是由这种蛋白被驱动的。在质膜上每个囊泡的出现

开始于包涵素被小窝。包涵素分子在膜的胞质面组装成网格状的结构，就是这种组装过程促使膜成形为小窝，继之形成小囊(图 3－42、3－45A)。围绕在每个凹陷小窝的颈部，有一



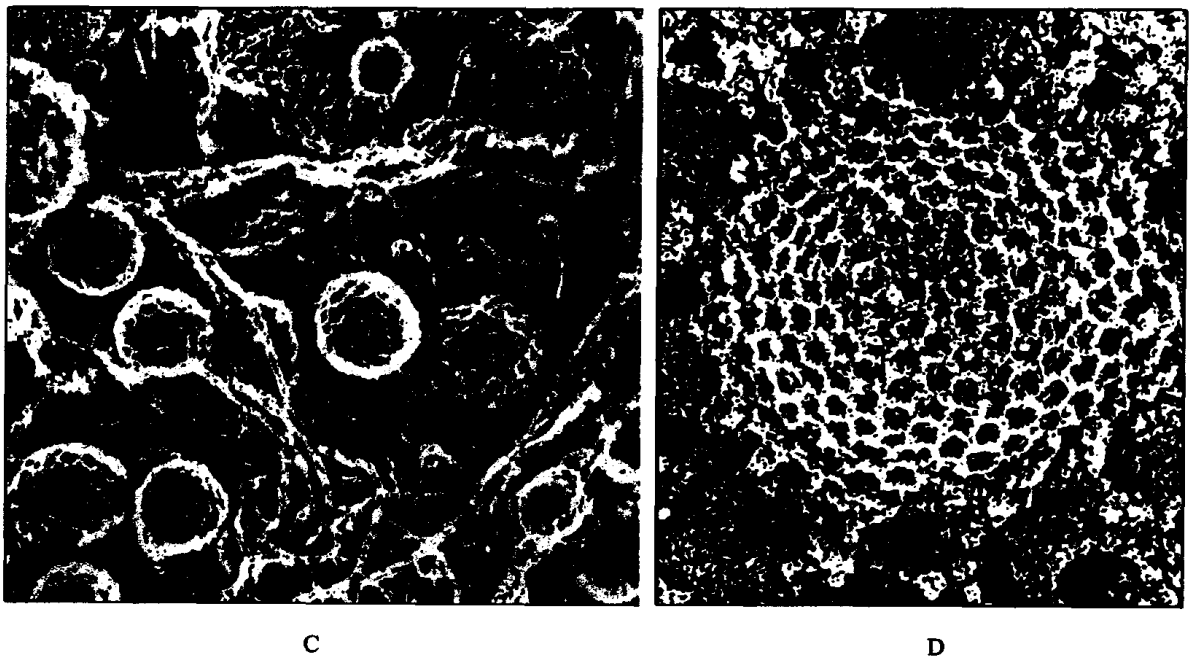


图 3－44 有被小囊和有被小窝的包被结构

A. 三叉辐射型单体(三腿蛋白)的电镜照片，插入图示每个三腿蛋白包括 3 个包涵素多肽(重链)和 3 个较小的多肽链(轻链)(位于每个重链腿内侧)；B. 一个有被小囊分子组装示意图，包涵素三腿蛋白与接合器蛋白组装成有被小囊的外被，每一接合器是 4 种多肽亚单位的复合物，接合器的排列是根据对接合器不同的多肽与三腿蛋白之间相互作用的研究确定的；C. 小鼠肝细胞质膜内表面许多有被小囊和有被小窝的电镜照片；D. 一个有被小囊的多面体篮进一步放大的电镜照片(用冰冻断裂蚀刻法制备)(A 自 E. Ungewickell, D. Branton；B 自 S. Schmid；C、D 自 N. Hirokawa, J. Heuser)

小的 GTP 结合蛋白称为动力蛋白(dynamin),组装成一个环。当动力蛋白水解其结合的 GTP 时,引起环的收缩,由此使深陷的小窝从膜上脱落,成为小囊。

在有被小窝和有被小囊的包被上,还有另一类重要蛋白是接合素(adaptin),或称接合器复合物(adaptor complex)。它是 4 个多肽亚单位的复合物,能识别特异的跨膜蛋白受体并连接到包涵素被上(图 3－44B、3－45B)。包涵素被看不出其特异性,而接合素则不同,它能介导不同类型的受体(捕获不同类物质)。接合素识别的受体胞质面的尾部肽信号(peptide signal)是受体介导的内吞作用质膜表面受体的共同信号。实际很复杂,哺乳动物常通过亚单位的调换而具特异性,如接合器中间链 μlA 和 μlB 很相似,但只有 APl 接合器复合物含有 μlB,能有效地运输 LDL 颗粒和传铁蛋白。此外,尚有不同的有被小囊称为 COP－被,是在 ER 和高尔基器之间,或从高尔器的一部分到另一部分运输分子(详见第 4 章 4.4 高尔基器)。

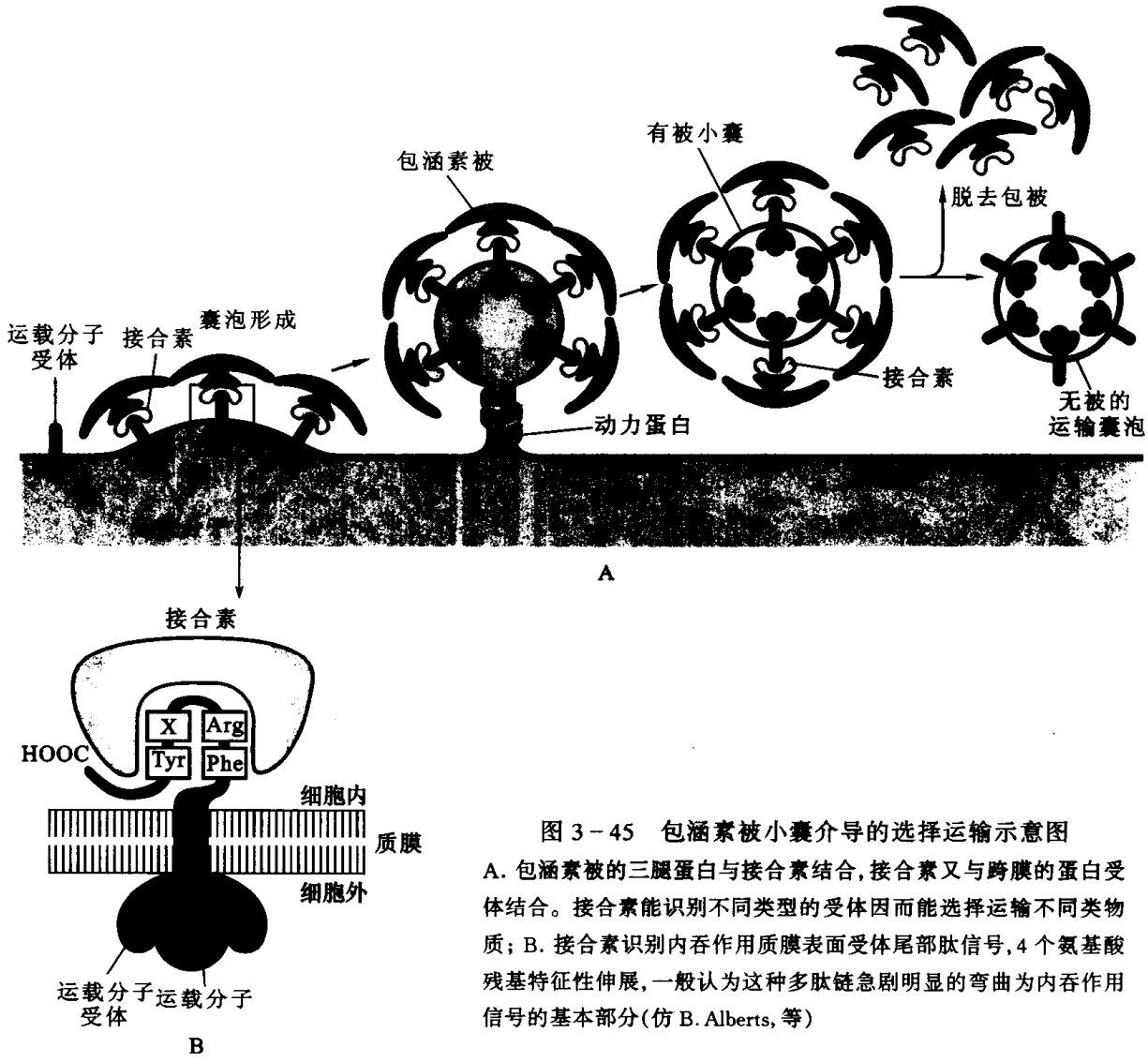


图 3－45　包涵素被小囊介导的选择运输示意图

A. 包涵素被的三腿蛋白与接合素结合,接合素又与跨膜的蛋白受体结合。接合素能识别不同类型的受体因而能选择运输不同类物质; B. 接合素识别内吞作用质膜表面受体尾部肽信号,4 个氨基酸残基特征性伸展,一般认为这种多肽链急剧明显的弯曲为内吞作用信号的基本部分(仿 B. Alberts, 等)

至于有被小囊脱去被的机制,尚未完全确定,一种可能性是受 Ca^{2+} 的控制。Ca^{2+} 能结合到包涵素的轻链使包涵素被不稳定。在质膜上的 Ca^{2+} 泵,将 Ca^{2+} 泵出细胞,因此在质膜胞液面维持 Ca^{2+} 的浓度较低,有被小窝能存在。当有被小囊形成并离开膜,它们遇到较高浓度的 Ca^{2+},触发其脱去被。

2. 胞内体:有被小囊形成后离开质膜,几秒钟即脱去被与早胞内体(early endosome)融合。在胞内体膜上有 ATP 驱动的 H^+ 泵,它将 H^+ 从胞液泵入胞内体腔中,使腔内呈酸性(pH 6,晚胞内体比其酸性强)。在腔内酸性环境中,许多内化的受体蛋白(internalized receptor protein)改变构象并释放其配体,再经过胞内体管状区出芽,将受体蛋白与配体分在 2 个囊泡中,受体返回质膜,配体最后到溶酶体中被降解(或者也有配体仍结合于受体,由胞内体到溶酶体被降解)。一般认为胞内体是内吞途径的分选站,其中酸性环境起着关键作用。如果用提高胞内体 pH 的试剂,阻碍配体 - 受体分离,由此减少了细胞可重新利用的受体,而抑制了受体介导的内吞作用。在胞内体中配体与受体被分离,用抗体标记唾液糖蛋白(asialo-glycoprotein, ASGP)配体和 ASGP 受体分子在电镜下也已证实:ASGP 配体聚集在胞内体小囊内,ASGP 受体在胞内体的管形部分(图 3 - 46)。

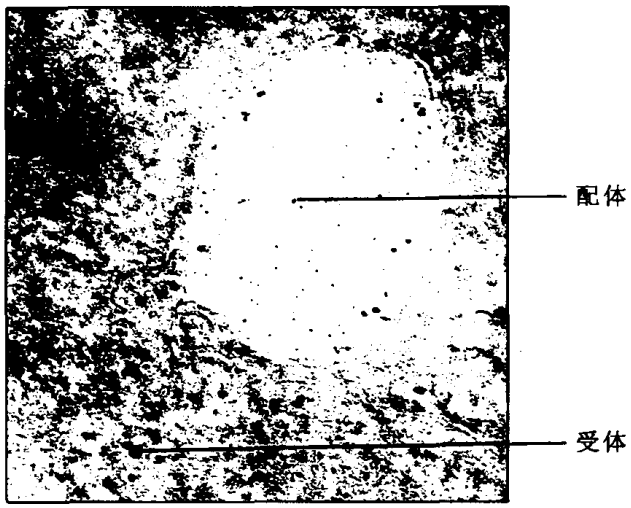


图 3 - 46 大鼠肝细胞中胞内体电镜照片
用抗 ASGP 抗体和抗 ASGP 受体的抗体双标记并分别复合以 5 nm 和 8 nm 金颗粒,ASGP 配体与其受体已经分离。在胞内体的球形小囊内有游离的配体(小颗粒),在胞内体的管形部分内有游离的受体。×7 500(引自 H.J.Geuze)

3. 受体蛋白:参加不同类型分子内吞作用的受体,已知起码有 25 种以上。它们所有的都经包涵素被小窝的途径。其中许多受体如 LDL 受体,不管其是否与特异的配体结合,都能进入有被小窝;其他的只有与特异配体结合才能进入。这说明,受体结合到有被小窝,需要由配体诱导受体构象的变化。大部分受体不能累积在包涵素被小窝中,是由于包被蛋白亚单位的不同而有分子筛的功能。通过内吞作用的受体和配体复合物均进入胞内体,其后,受体蛋白(和任何与其结合的配体)的命运根据其类型不同而异,可分为 3 个途径:①大部分受体返回到原来的同一质膜的结构域,如前已述及的 LDL 受体;②有些受体(包括其配体)最后进入溶酶体被降解;③有些受体转到质膜的不同结构域,由此介导了细胞转移作用(transcytosis)的过程。在极性上皮细胞表面有一些受体通过细胞转移作用将特定的大分子从细胞的一个外空间转移到另一个空间。例如,哺乳动物(和人),其幼体从母乳中获得抗体就是通过细胞转移作用,这些抗体与幼体消化管上皮吸收表面相应的受体结合(在酸性 pH),经包涵素被小窝和小囊内化到胞内体,由胞内体形成的运输囊泡运至上皮细胞基侧部,并与基侧部质膜融合,经外排作用至细胞外液中(中性 pH),抗体从受体上分离下来,最后进入到幼体血流中。这些抗体分泌到母体乳中也是通过细胞转移作用,只是方向与之相反,是从血液到乳汁中。

3.3.3.2 外排作用

细胞的外排作用有两种途径:组成外排途径(constitutive exocytosis pathway)和调节外

排途径(regulated exocytosis pathway)。如在细胞内,从高尔基器反面形成的分泌囊泡,稳定地流动到质膜,囊泡膜与质膜融合,囊泡膜的蛋白和脂类成为质膜的新成分,囊泡内的可溶性蛋白分泌到细胞外。组成外排途径或称组成分泌途径(constitutive secretory pathway)是连续地运输囊泡到质膜与其融合,提供新合成的脂类和蛋白,这也是细胞分裂前质膜生长的途径,囊泡内的物质释放到细胞外,有一些到细胞表面成为质膜的外在蛋白;有些掺入到细胞外基质;还有其他的扩散到细胞外液体中,作为营养或发信号给其他细胞。

调节外排途径仅存在于特化的分泌细胞,产生大量的特定分泌物,如激素、粘液或消化酶等,贮存在分泌囊泡中,从高尔基器出芽,运输囊泡到质膜处,先不与质膜融合,而是累积在近质膜处,只有当细胞外信号刺激细胞时,它们才与质膜融合,释放其内容物到细胞外(图 3-47)。例如,血糖增加发信号给胰腺 β 细胞分泌胰岛素(图 3-48)。通过这种途径注定到分泌囊泡的蛋白质,其表面有一种特性——在一定的离子条件(酸性、高 Ca^{2+})下引起彼此聚集,这些聚集的蛋白通过一种机制识别,并包装成分泌囊泡从高尔基网脱落下来。组成外排途径的分泌蛋白不聚集。这种选择聚集的另一功能,它使分泌蛋白在分泌囊泡中的浓度大为增高,当触发分泌时能快速地释放大量的蛋白分泌物。

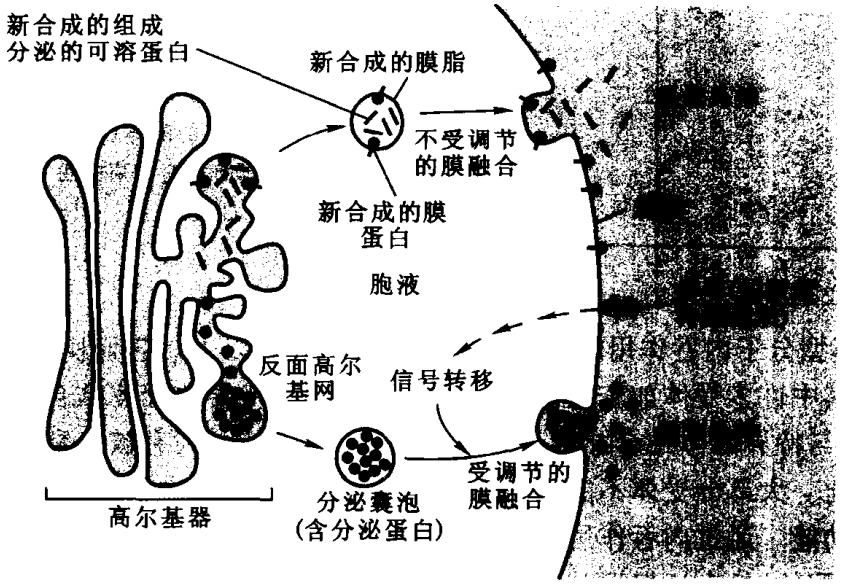


图 3-47　组成外排途径和调节外排途径

这 2 个途径是从反面高尔基网分出的,许多可溶性蛋白通过组成外排途径连续从细胞分泌排出,它存在于所有细胞。特化的分泌细胞具有调节外排途径,在反面高尔基网被选择的蛋白转移到分泌囊泡,蛋白浓缩、贮存,直到细胞外信号刺激时,才分泌(仿 B. Alberts, 等)

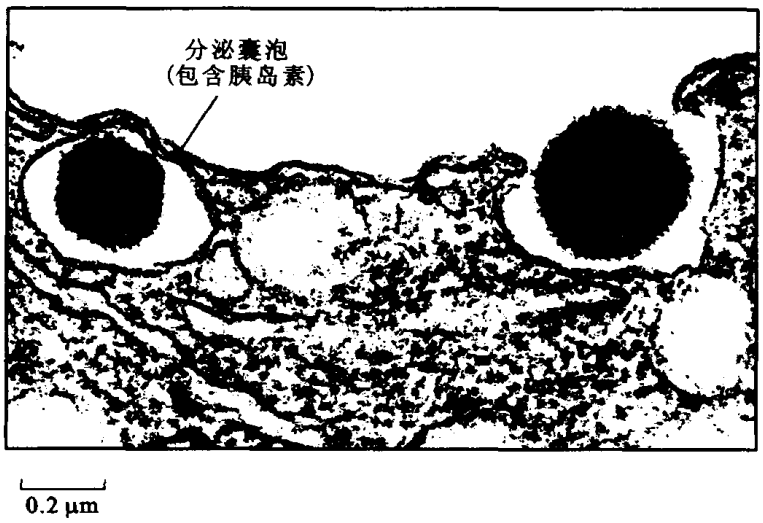


图 3-48　分泌囊泡的调节外排作用

电镜照片示胰腺 β 细胞释放胰岛素到细胞外,在每个分泌囊泡中胰岛素呈高浓度贮存,只有当血中葡萄糖水平增加,发信号给细胞才分泌(自 L. Orei, 等)

3.3.3.3 内吞外排囊泡如何准确地到达靶膜

在细胞内复杂的膜系统中,囊泡从膜出芽形成后能有序地准确地抵达靶膜。已知运输囊泡从供体细胞器获得其内容物是有选择的,它们与靶膜融合也必然有高度选择性。这表明细胞内各类型的运输囊泡应有其表面标志以显示其来源和内容物。过去曾认为这涉及一类称为 SNAREs 蛋白的作用。现在有更多的研究表明,这种重要的标志和识别是由单体 GTP 酶家族(family of monomeric GTPase)的一些成员称为 Rab 蛋白来完成(Rab 是 Ras 超家族 GTP 酶中的一个亚家族)。单体 GTP 酶也称单体 GTP 结合蛋白(monomeric GTP - binding protein),这些蛋白是触发两种构象状态的分子开关:与 GTP 结合是活化的,与 GDP 结合是钝化的。

当 Rab 结合到 GTP,它可与许许多多不同的称为 Rab 效应物(Rab effector)的蛋白相互作用。这些 Rab 效应物完成不同的功能:从囊泡出芽到囊泡经由胞质骨架的囊泡运输和在靶膜上囊泡停泊。在囊泡运输中 Rab 蛋白具多样性。不同的 Rab 蛋白位于不同囊泡和细胞器的膜上(表 3 - 2),由于它特异的分布,起了标志蛋白作用。Rab 蛋白的氨基酸序列在接近羧基端尾部大部分不相似。应用遗传工程技术作尾部交换实验(tail swapping experiment)表明,就是尾部决定了家族每个成员在细胞内的位置。现已知,至少有一些 Rab 蛋白在实验条件下在功能上是可互换的,能定位到新的细胞器。

表 3 - 2 一些 Rab 蛋白的亚细胞位置

蛋白质*	细胞器
Rab1(Ypt1)	ER 和高尔基器
Rab2	转移 ER,顺面高尔基网
Rab3A	分泌囊泡
Rab4	早胞内体
Rab5	早胞内体,质膜
Rab6	中间的和反面高尔基扁囊
Rab7	晚胞内体
Rab9	晚胞内体反面高尔基网
Sec4	分泌囊泡

* 所有这些蛋白都是在哺乳动物细胞发现的,除了 Sec4 和 Ypt1 为酵母蛋白

根据 Rab 蛋白的定位和 GTP 状态,Rab 能聚集和/或活化其各种各样的不同的效应物在适宜的时间到达适宜的位置,这样调节囊泡的运输,使其能准确抵达靶膜。现已知人类基因组 Rab 家族成员为 60(表 3 - 3)。由于 Rab 通过与其效应物相互作用完成大部分功能,只要我们对 Rab 效应物和 GDP/GTP 交换因子能完全了解,才能更好地掌握它们所有功能。Rab 效应物较难鉴定,因为它们几乎没有什么序列的同源性,传统的基因组学没什么帮助,有待结构基因组学来解决。有证据表明,在囊泡运输中 Rab 有两个作用:一个是基本的,一个是更精细的调节作用。在酵母,Ypt1(Rab1)从内质网到高尔基器的运输是基本的;而 Rab3A 存在于突触囊泡,看来有调节作用。通过 Rab 蛋白及其效应物的作用,使运输囊泡能准确地达到靶膜。运输囊泡抵达靶膜的距离如果短(像从 ER 到高尔基器),则囊泡通过简单地扩散运动;如果距离比较长(像从高尔基器到一个长的神经细胞端部质膜),囊泡则通过沿着细胞骨架纤维移动的马达蛋白(motor protein)进行主动运输(参看第 6 章)。

表 3-3 运输囊泡家族成员的数目

	酵母(*S. cerevisiae*)	线虫(*C. elegans*)	果蝇(*D. melanogaster*)	人
包被复合物(亚单位)	6(31)	6(29)	6(29)	7(53)
Rabs	11	29	26	60
SNAREs	21	23	20	35
Qa - SNAREs/syntaxins	7	9	7	12
Qb - SNAREs/SNAP Ns	5	7	5	9
Qc - SNAREs/SNAP Cs	6	4	5	8
R - SNAREs/VAMPs	5	6	5	9
Sec ls	4	6	5	7
全部预测的基因	6 241	18 242	13 601	30 000～50 000

(自 J.B.Bock, 等, 2001)

3.3.3.4 囊泡膜与靶膜融合

运输囊泡一旦已识别其靶膜并停泊在该处,此后需经囊泡膜与靶膜融合释放其内容物。但是膜融合不都是立即发生的。如已知的调节外排作用,直到细胞外信号触发才发生融合。停泊(docking)和融合(fusion)是两个不同的过程。停泊仅是两膜充分接近,从脂双层突出的蛋白能相互作用和粘附;融合需要更多地接近,使两个脂双层的距离达到1.5 nm之内。这样接近,必然要移动膜亲水表面的水——这是一个高能的过程。过去推测,很可能细胞所有的膜融合都是通过特化的融合蛋白(SNAP 和 NSF)催化的。现在认为,囊泡到达靶膜融合位点停泊,是 GTP 结合的 Rab 蛋白和效应物的作用。囊泡膜与靶膜融合是由 SNARE 蛋白家族(SNARE protein family)介导的。SNARE 已被分出 4 个亚家族(表 3-3),它是整合膜的蛋白,存在于囊泡膜和靶膜。囊泡膜和靶膜的 SNARE 能形成很稳定的复合物。由于 SNARE 复合物的形成,拉动囊泡和靶膜在一起,并可提供能量驱动脂双层融合。已提出一种独特的 SNARE 复合物,包含有 4 个螺旋,在每个融合位点形成(图 3-49)。例如,突触囊泡和突触前神经末端融合,是由 SNARE 4 螺旋的复合物(syntaxin IA、VAMP-2 和 2 个 SNAP-25)介导的。这 4 个螺旋是原型(prototype),用它能确定 SNAREs 的亚型。不同的 SNARE 家族的成员,位于所有真核细胞不同的房室,这样定位形成特异复合物,加强了囊泡运输最后一步的精确性。

SNARE 家族从酵母到果蝇,大部分没有变化,但到人类已有明显增加(表 3-3)。在哺乳动物,具有更多的 SNARE 蛋白有差异的表达。例如,syntaxin 17 在产生类固醇的细胞大量表达;神经递质是由 syntaxin 1A 和 B 介导的,在神经元中最丰富。很清楚,虽然多细胞生物能以 SNARE 核心组行使功能,但额外增加 SNARE 也可导致囊泡运输具组织特异性。与 SNARE 的亚家族 syntaxin 相互作用的另一类重要蛋白家族是 Sec l(图 3-49、表 3-3)。它是胞液蛋白,通过它部分与 syntaxin 相互作用与膜周边结合。在已测定的基因组中,Sec l 与 syntaxin 的比率大体保持恒定。Sec l 的初步作用可使 syntaxin 的构象能与其他 SNARE 相互作用,很可能 Sec l 是"伴娘"蛋白。正如 SNARE 的情况一样,Sec l 基因的增加能归因于运输量的特殊化。例如,Sec l 家族成员 mUNC-18c 与 syntaxin 4 相互作用,涉及到对胰岛素的反应,运输葡萄糖的载体蛋白移位到细胞表面。Sec l 对囊泡运输是基本的,在酵母,如果使 Sec l 失效,就丧失了外排作用。

内吞和外排作用由囊泡运输来完成。从囊泡形成、脱落、有序地转移与靶膜融合是一个

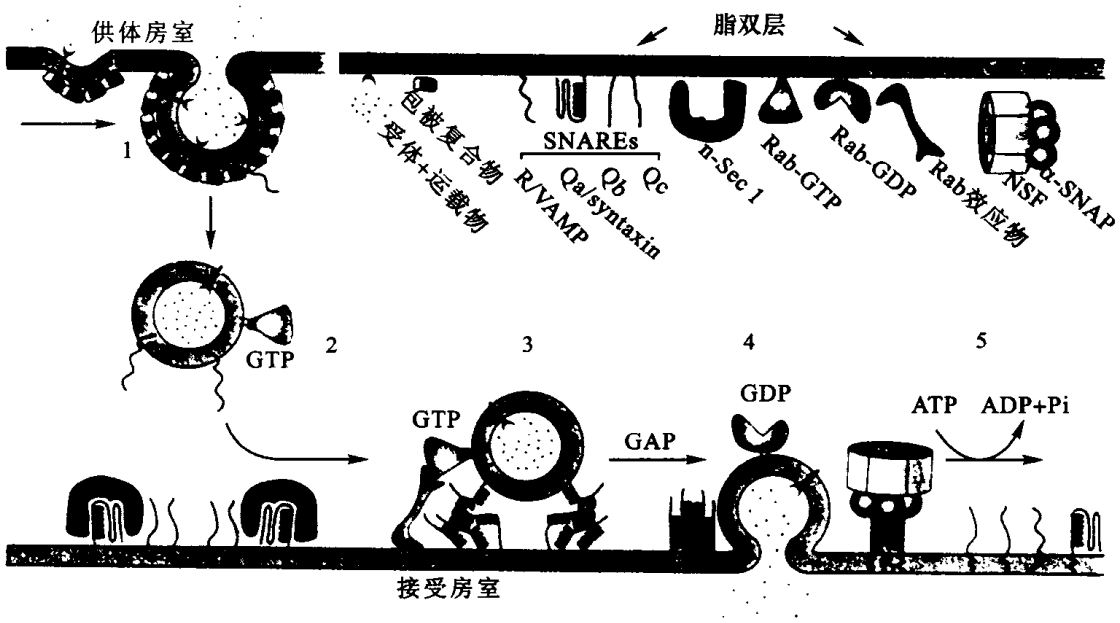


图 3-49 运输囊泡的生活周期

1. 出芽:包被蛋白聚集并组装,形成有被小窝、有被小囊,有选择地摄入运输物。脱去包被蛋白到胞液中再循环。
2. 运输:携带 Rab-GTP 及 R-SNARE(VAMP)的囊泡向靶膜运输。
3. 停泊:囊泡达到靶膜融合位点 GTP 结合的 Rab 蛋白和其效应物相互作用,进行囊泡膜与靶膜识别。伸长的螺旋蛋白及其他因子的作用(未表示)。停泊之后,来自供体膜的 R-SNARE(VAMP)与来自靶膜的 Qa-SNARE(syntaxin)、Qb-SNARE(SNAP-N)和 Qc-SNARE(SNAP Cs)组装形成一平行的 4-螺旋束,Sec ls 与 Qa-SNARE 相互作用,对形成核心融合复合物(core fusion complex)可能很关键。
4. 融合:在三元的核心融合复合物成核之后,平行的螺旋进一步像拉链式地使囊泡膜和靶膜拉紧在一起,也许这驱动了融合反应。
5. 去组装:融合之后,通过 GDP-分离抑制物(GDP-dissociation inhibitor, GDI)Rab-GDP 从膜中被释放,回到供体膜。SNARE 复合物是通过 ATP 酶 NSF(N-ethylmalemide-sensitive factor)和 α-SNAP 去组装。因此,SNAREs 能作为下一轮运输再循环。

(自 J.B.Bock,等,2001)

非常复杂的过程,涉及到多种蛋白的相互作用。最近有些学者通过对人类基因组测序的研究,为了探索细胞房室组织的分子机制,比较了 4 种真核基因组有关囊泡运输的蛋白家族。这一结果不仅使我们对囊泡运输各阶段有了较为深入的认识,而且发现介导囊泡运输的蛋白家族在系统发育从酵母到人以及所有细胞从内质网到高尔基器,每种囊泡的运输步骤都涉及来自这些蛋白家族的一组相似的蛋白。囊泡被的数目从酵母到人仅略有增加(从 6 到 7),但是每种囊泡被亚单位的数目确有显著增加。这说明不是发展了囊泡运输的步骤,而是增加了调节运输物复杂性的机制。哺乳动物有一调节体系通过亚单位的交换能得到特异性。Rab 家族从酵母、线虫到果蝇没有重要的发展,进化到哺乳动物到人则有显著的增加。这意味着哺乳动物协调复杂化的生理过程,不仅有更细微的调节也有组织特异化作用。SNARE 家族从酵母到果蝇大部分无变化,到人则有明显增加,哺乳动物具有更多的 SNARE 蛋白不同的表达。总之,有关囊泡运输的这 4 个蛋白家族,进化上从单细胞到多细

胞生物,作为运输囊泡基础的核心机器(包被、SNAREs、Sec ls)没什么增加,在哺乳动物主要更多地增加了调节机制。

内 容 提 要

细胞膜是所有细胞的重要组成部分。由于膜的存在才确定了细胞为生命的基本单位。在真核细胞中还有构成各种细胞器的膜称为细胞内膜。细胞膜和细胞内膜统称为生物膜。

关于膜的分子结构:由于质膜太薄光镜下看不见,所以首先从膜的透性开始研究。19世纪后期研究膜透性提出细胞表面有一类脂层。1925 年通过实验提出膜是由双层脂类构成。这一结论为许多模型接受,一直应用到现在。在电镜下观察膜提出了单位膜模型(1959)。由于技术的发展又提出了许多新的模型。其中流体镶嵌模型(1972)受到广泛地支持。该模型认为,脂双层是膜的构架,球形蛋白分子按其所在位置分为内在蛋白和外在蛋白;强调膜内脂类和蛋白质分布不对称性和膜的流动性;认为使分子聚在一起是蛋白 - 蛋白、蛋白 - 脂类、脂类 - 脂类的相互作用,主要是疏水的和亲水的两种非共价键的相互作用。

膜脂双层是所有膜的基础结构。构成膜的脂类有磷脂、胆固醇和糖脂。其中磷脂最为丰富且有多种。不同膜脂在不同类型的细胞膜中含量比例分布不同。磷脂分子一个重要特征是极性强,为双型性分子(糖脂、胆固醇也是双型性分子),在水中能自发地形成双层分子,又能自我封合为脂质体。这些特性及其流动性对构成生物膜主要组分有意义,且为膜蛋白(包括酶)维持构象、表现活性提供适宜环境。

膜蛋白是膜的重要组分,完成膜的大部分功能。在膜中,蛋白质的种类和数量反映膜功能的复杂程度,功能较简单的含大量脂类,功能复杂的蛋白质含量高。膜的外在蛋白为水溶性的,由离子键或非共价键或其他较弱的键与膜表面的蛋白或脂类结合;内在蛋白嵌入脂双层,多为跨膜蛋白,它们以亲水或疏水部分非共价键结合。膜蛋白和膜脂如何结合是膜分子结构的重要问题,已知有以下几类方式:①膜蛋白以 α 螺旋单次或多次跨膜;②β 筒跨膜(一些多次跨膜蛋白排列成封闭的 β 片);③形成大的蛋白复合物跨膜;④通过共价结合的脂类基团与脂双层结合;⑤通过与膜蛋白非共价的相互作用。

膜的流动性是生物膜的基本特性之一。构成膜的脂类在一定温度下可由液晶态转变为晶态或反之。各种膜脂由于其组分不同各有其相变温度。生物膜中脂类的组分较复杂,在生理温度下也有分相现象。在相变温度以上时,液晶态的膜脂总的是处于流动状态,膜脂分子具不同形式的运动:侧向扩散、旋转运动,翻转运动,还有伸缩振荡运动以及左右摆动等。影响膜脂流动的因素主要来自于膜本身的组成成分(如胆固醇的多少、脂肪酸链、不饱和键的含量、链的长度及卵磷脂/鞘磷脂的比值等)以及遗传、环境的理化因素。膜蛋白的运动大致分为侧向扩散和旋转运动。膜蛋白的运动性也受许多因素的影响和限制(如外在蛋白、细胞骨架以及与膜脂类分子的相互作用等等)。膜的流动性对细胞正常功能的进行是必需的。已知的如膜上的酶活性、膜的物质运输、细胞的信息传递、激素、药物的作用等均与膜的流动性相关。在发育中、在细胞周期中膜的流动性有变化,还与农作物的抗寒性有关。

细胞被普遍存在于动物细胞表面,主要由糖脂、糖蛋白(寡糖链与膜脂、膜蛋白共价结合)及蛋白多糖(由多糖链与膜蛋白结合)等组成。在膜中存在的单糖约 9 种,其中唾液酸残基位于糖侧链末端是真核细胞的标志。糖脂和糖蛋白的寡糖链通常不足 15 个糖残基,常有

分支。在不同细胞被内单糖链的糖排列组合是极其多样的。近年已证明，结合质膜的外源凝集素能识别糖脂、糖蛋白的特异寡糖链，介导各种暂时的细胞－细胞粘附，如发炎反应。在细胞被中还有膜抗原，如 ABO 血型抗原、MN 血型抗原等。

细胞膜的重要功能之一是通过膜的物质运输。小分子和离子通过膜，主要由膜的运输蛋白来完成；大分子通过膜，则是由膜形成的囊泡进行运输。根据不同物质通过膜的方式可分为被动运输、主动运输和内吞外排 3 种运输途径。被动运输是物质通过自由扩散(或促进扩散)顺着浓度梯度由高向低扩散，不需要细胞提供能量。参与的运输蛋白分为通道蛋白和载体蛋白。通道蛋白又分为简单的水通道(水孔)和离子通道(门通道)。前者能通过水及小的水溶性物质；后者仅能通过离子，有高度选择性，一种通道只允许一种类型的离子通过。它与水孔不同，不是连续开放，是瞬时开放，对特定刺激发生反应时开放。门开关的转换是由于通道蛋白构象的变化，根据控制门开关条件分为配体门通道、电压门通道及压力激活通道。载体蛋白能与一些小的有机分子(如糖、氨基酸、核苷酸等)结合通过膜。载体上的结合点只能与某一种物质进行暂时可逆地结合分离，不需 ATP 提供能量，而是按浓度梯度进行促进扩散，由载体构象变化将物质从膜的一侧运至另一侧。此外，还有离子载体，是小的疏水分子，也按被动运输途径运输离子，如缬氨霉素、离子载体 A23187 和短杆菌肽 A 等。

主动运输与被动运输不同，是物质逆着浓度梯度或电化学梯度由低向高梯度运输，需要细胞提供能量。这种运输对保持细胞内的离子成分及输入一些细胞外比细胞内浓度低的物质是不可缺的。主动运输有 ATP 驱动泵、协同运输、光驱动泵 3 种主要方式：①ATP 驱动泵，这类泵本身是一种载体蛋白，也是一种 ATP 酶，它催化 ATP 水解提供能量。由于运输溶质不同而分为 Na^+-K^+ 泵和 Ca^{2+} 泵等。②协同运输是由 Na^+-K^+ 泵和载体协同运输物质。如动物细胞对葡萄糖、氨基酸的主动运输，是由膜上的 Na^+-K^+ 泵泵出 Na^+ 所产生的电化学梯度使物质通过与载体结合(Na^+ 及糖或氨基酸等)进入细胞。植物细胞、真菌和许多细菌质膜无 Na^+-K^+ 泵，而有 H^+ 泵将 H^+ 泵出细胞，通过 H^+ 的电化学梯度，将糖、氨基酸等带入细胞内。③光驱动泵，在一些光合细菌膜上有 H^+ 泵，由光激活 H^+ 泵的活性，产生 H^+ 的电化学梯度驱动溶质进入细胞。

内吞和外排作用，是通过囊泡运输大分子(蛋白质、多核苷酸、多糖等)进出细胞，属主动运输过程。当细胞摄入大分子或颗粒时，被摄入物先附于细胞表面，该处质膜凹陷，然后脱落下来形成小囊泡进入细胞，是为内吞作用。根据形成囊泡的大小和内容物，分为两种类型：内吞物质如为固体物，形成的囊泡较大，称为吞噬作用；若为液体或溶质，形成的囊泡较小，则称为胞饮作用。吞噬作用主要由特化的吞噬细胞进行，该类细胞表面有种种与吞噬有关的受体，它能识别抗体(抗体蛋白结合在细菌等表面)。吞噬是一个触发的过程，即由被吞噬物激活表面受体，传递信号到细胞内，发生反应。大部分动物细胞是通过受体介导的内吞作用使许多特定的大分子进入细胞。某种大分子(配体)结合到细胞表面受体，该处质膜胞质面有蛋白被形成有被小窝，进一步凹陷、脱落形成有被小囊。这是选择的浓缩机制。通过这种机制使许多物质包括许多基本代谢物(如维生素 B_{12}、铁、胆固醇)、一些激素、一些酶以及一些病毒进入细胞。其中胆固醇是典型的一例。现已知有被小窝和有被小囊的被是由包涵素形成的三叉辐射型单体聚合成网格状结构。由于包涵素分子在胞质面组装促使膜形成小窝。动力蛋白在小窝颈组装成环，环收缩，小窝脱落形成小囊。包被上另一类重要蛋白为接合素，能识别特异的跨膜蛋白受体，并连接到包涵素被。有被小囊去被后与胞内体融合，

受体与配体复合物进入胞内体后,其去向有 3:①大部分受体在胞内体酸性环境中改变构象释放配体,受体又返回到原来的质膜,配体最后到溶酶体被降解;②有些受体与其配体最后进入溶酶体被降解;③有些受体通过细胞转移作用转到质膜的不同结构域。

外排作用与内吞作用的顺序相反,有些大分子从细胞内部移至质膜,囊泡膜与质膜融合,排出其内容物。外排作用分为组成外排途径和调节外排途径。前者是囊泡连续流动到质膜与质膜融合,其蛋白和脂类成为质膜的新成分;后者存在于特化的分泌细胞,所产生的特定分泌物,如激素、粘液、分泌酶等囊泡流动到质膜处先不融合,而是累积在近质膜处,等待细胞外信号刺激细胞时才与质膜融合。如血糖增加发信号给胰腺 β 细胞分泌胰岛素。

内吞和外排囊泡如何准确地到达靶膜,它们与靶膜融合有高度选择性,这表明细胞内所有各类型的运输囊泡应有其表面标志,以显示其来源和内容物。现已知这种重要的标志和识别是由 Rab 蛋白及其效应物来完成的。不同的 Rab 蛋白位于不同的囊泡和细胞器膜上,由于它特异的分布起了标志蛋白作用。当 Rab 结合到 GTP,它可与许多不同的称为 Rab 效应物的蛋白相互作用,Rab 效应物完成不同的功能。根据 Rab 蛋白的定位和 GTP 状态,Rab 能聚集和活化它的不同效应物,在适宜时间到适宜的位置,这样调节囊泡运输,使囊泡能准确地抵达靶膜。囊泡膜与靶膜融合是由 SNARE 蛋白家族介导的。SNARE 已被分出 4 个亚家族,它是整合膜蛋白,存在于囊泡膜和靶膜,并能形成稳定的 SNARE 复合物。由于 SNARE 复合物的形成拉动囊泡膜和靶膜在一起驱动脂双层融合。已提出一种独特的 SNARE 复合物,包含 4 个螺旋,平行的螺旋像拉链式地使囊泡与靶膜紧拉在一起融合。不同的 SNARE 家族成员位于真核细胞不同的房室,这样定位形成特异复合物,加强了囊泡运输后融合的精确性。

思 考 题

1. 细胞质膜和生物膜有何联系与区别? 如何理解质膜的出现和存在的重要性。
2. 为什么研究质膜是从生理功能——膜的透性开始研究? 19 世纪后期和 20 世纪中期对膜结构研究有何重要贡献,试举例说明。
3. 试从单位膜模型和流体镶嵌模型的内容和特点分析它们各存在哪些优点和不足,并简要说明现在一般认可的生物膜的分子结构。
4. 膜脂双层主要由哪些脂类构成? 它们有何共同特点又如何说明它们具有多样性。生物膜中的脂类具有自我组装、自我封合的特性是根据什么说的? 膜脂在膜中的主要作用是什么?
5. 一般认为在膜中蛋白质的种类和数量反映了膜功能的复杂程度,试举例说明。膜中的内在蛋白和外在蛋白各有何特点?
6. 膜蛋白与膜脂的结合,已知有哪几类结合方式,简要说明。
7. 什么叫相变、相变温度、分相? 为什么了解膜的流动性需要有这方面的概念? 并简要说明根据什么技术测知膜脂的流动性,有几种流动方式? 并从膜脂组成分分析影响膜脂流动性的因素。
8. 根据什么证明膜蛋白具有运动性,有几种运动方式? 并简要说明影响和限制其运动的主要因素。
9. 试简要说明膜流动性有何生物学意义。
10. 细胞被主要由哪些大分子组成? 它是否属细胞膜的正常组分? 与细胞外基质能否区分? 细胞被的主要功能是什么? 试从细胞被与分子识别以及与血型抗原关系说明细胞被功能的重要性。
11. 物质(小分子、离子、大分子)通过膜的运输有哪几个途径,各有何特点?

12. 被动运输与主动运输有何不同，参与被动运输的膜运输蛋白主要有哪两大类，离子载体是否属被动运输？
13. 通道蛋白所形成的水通道和离子通道（门通道）主要有哪些区别，根据控制门开关条件的不同分为哪几种类型的离子通道，各存在于哪类细胞，有何特点？离子通道对细胞有何重要作用？
14. 载体蛋白是另一类运输蛋白，它如何将一些小的有机分子（糖、氨基酸、核苷酸等）运输通过膜，是否需要细胞提供能量，可举一例（如哺乳动物肝细胞质膜上葡萄糖载体）说明。
15. 细胞进行主动运输主要有哪3种方式，各有何特点，各以何种方式运输何种物质，试以一例说明其中一种方式的运输过程。如何证明在主动运输过程中需要能量？
16. 试简要说明葡萄糖通过膜的运输是通过什么途径和方式，在饥饿时和饭后葡萄糖通过膜运输的方向会有何不同，为什么？
17. 内吞作用和外排作用主要运输什么样的分子通过膜，内吞作用中的胞饮作用和吞噬作用有何不同，并举一例简要说明受体介导的内吞作用过程。有哪些类物质通过这种途径进入细胞？
18. 初步了解有被小窝和有被小囊的包被是由什么构成的，它们的组装和动力蛋白的组装以及接合素各有何主要作用，胞内体结构有何特点，在内吞途径中有何重要作用，通过内吞作用的受体－配体进入胞内体后受体蛋白的去向如何？并举例说明什么是细胞转移作用。
19. 细胞的外排作用通过哪两种途径进行，各有何主要特点，举例说明。
20. 初步了解内吞、外排的囊泡如何能准确地到达靶膜，它们的识别主要是通过哪类蛋白的相互作用，囊泡膜和靶膜融合的机理就现在已知的是什么？

参考资料

1. 汪堃仁，薛绍白，柳惠图主编. 细胞生物学. 第2版. 北京：北京师范大学出版社，1998. 52～109
2. 翟中和，王喜忠，丁明孝主编. 细胞生物学. 北京：高等教育出版社，2000. 73～123
3. Alberts B, Bray D, Johnson A, *et al*. Essential Cell Biology. New York & London: Garland Publishing Inc, 1998. 347～369, 371～406, 462～467, 470～476
4. Alberts B, Bray D, *et al*. Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. New York and London: Garland Publishing Inc, 1994. 477～547、618～647
5. Karp G. Cell and Molecular Biology. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons Inc, 1999. 122～181
6. Graham J M, Higgins J A. Membrane Analysis. New York: Springer-Verlag, 1997. 1～42, 87～118, 145～198
7. Van Winkle L J. Biomembrane Transport. San Diego: Academic Press, 1999
8. Armstrong D L, Rossie S, ed. Ion Channel Regulation. San Diego, London, New York: Academic Press, 1999
9. Deamer D W, Kleinzeller A, Fambrough D M, ed. Membrane Permeability: 100 years since Ernest Overfon. San Diego: Academic Press, 1999
10. Zimmer G, ed. Membrane Structure in Disease and Drug Therapy. New York: Marcel Dekker, 2000
11. Bock J B, Matern H T, Peden A A, *et al*. A genomic perspective on membrane compartment organization. Nature, the human genome, 2001, 409: 839～841

第4章

细胞内膜系统

内膜系统(endomembrane system)为真核细胞所特有。它包括细胞内在结构、功能或发生上相互联系的有界膜的细胞器。诸如内质网、高尔基器、胞内体、溶酶体、线粒体、叶绿体、过氧物酶体及核被膜等由内膜形成的结构。对这些细胞器现在有些学者称其为房室(compartment)。房室的涵义比细胞器的广泛,但缺乏特异性。如高尔基器为房室,高尔基器的扁囊也称为房室(为了区分称其为区隔);内质网整个称为房室;可以说内质网有丰富的房室。又如原核细胞有单个房室。在细胞质内,除了有界膜的细胞器外,还有不具有界膜的细胞器,如核蛋白体、中心粒以及微管、微丝、中等纤维等。所有这些细胞器在细胞基质中各有其特异的蛋白质组成,包括其自身一些特征性的酶和一些特化的分子,具有一定的形态结构,各完成一定的功能。同时,各细胞器间及其与基质间相互依存,高度协调地进行各种功能活动。

4.1 细胞内的房室化和蛋白质的分选

一个典型的真核细胞进行几千种化学反应,其中许多是互相矛盾的。例如,一系列反应合成葡萄糖,而另一些反应是分解它。为什么在细胞内能同时进行很多不同的反应,且高效协调地进行各种代谢活动?原来细胞已发展有分离、组织其不同反应的机制。例如:①将催化特异反应的酶聚集成为一大的蛋白复合物,如原核和真核细胞共有的用于DNA、RNA和蛋白质合成的多蛋白复合物;②真核细胞高度发展的房室,就是限制不同的代谢过程及其所需要的蛋白和酶在不同的空间内。原核细胞由单个房室构成,即由质膜所围绕的细胞质;真核细胞由内膜进一步再分成许多房室,有成套的酶进行活动,不受其他房室发生反应的干扰。

4.1.1 房室化中蛋白质的重要作用

蛋白质在真核细胞的房室化中起着极为重要的作用。在每个房室中,蛋白质(酶)发生催化反应以及选择性地运输小分子进出其内部,在其膜上有负责其特异代谢物输入输出的运输蛋白。有输入输出特异蛋白的机制,并将输入蛋白掺入到房室内使其成为一种独特的结构。蛋白质也作为细胞器特异的表面标志(organelle - specific surface marker),指导新的

蛋白质和脂类分送到适宜的细胞器。一个哺乳动物细胞包含约 10 000 种 100 亿(10^{10})个蛋白质分子。蛋白质的合成几乎均开始于胞液中,然后每个新合成的蛋白质根据其氨基酸序列中的信号指示,被分送到需要它的细胞器,并由靶细胞器的互补受体蛋白来识别。真核细胞都有一套基础相同的细胞器,各完成其基本功能,每种细胞器又包含特征性的酶,一套协调其独立功能的不同的蛋白质。

4.1.2 蛋白质的分选和运输途径

已知蛋白质的合成一般起始于胞液中的核蛋白体上(仅有很少例外——在线粒体和质体的核蛋白体上),其后它们的命运决定于其氨基酸序列。在氨基酸序列中含有分选信号(sorting signal)的,被指导到胞液外的其他部位;大部分蛋白质没有分选信号,则保留在胞液中,作为"永久"的成分。为了理解分选信号在运输途径中的作用,先要区分蛋白质从一个房室到另一个房室运输的基本途径,概括地说有 3 种基本途径(图 4-1):①孔门运输(gated transport)或称为控制运输,是蛋白质通过核孔(复合物)在胞液和细胞核之间的运输,核孔(复合物)有选择控制的功能,它能主动运输特异的大分子和大分子的组装物,当然小分子也能自由扩散;②跨膜运输,由结合膜的蛋白转移器(protein translocator)直接运输特异蛋白从胞液横过膜到拓扑上不同的空间,这样运输的蛋白质通常是不折叠的,例如蛋白质从胞液开始被运输到内质网腔或线粒体是以此方式进行;③囊泡运输,从内质网到高尔基器、从高尔基器到质膜,可溶性蛋白的运输是通过这种方式(详见第 3 章内吞与外排作用部分)。

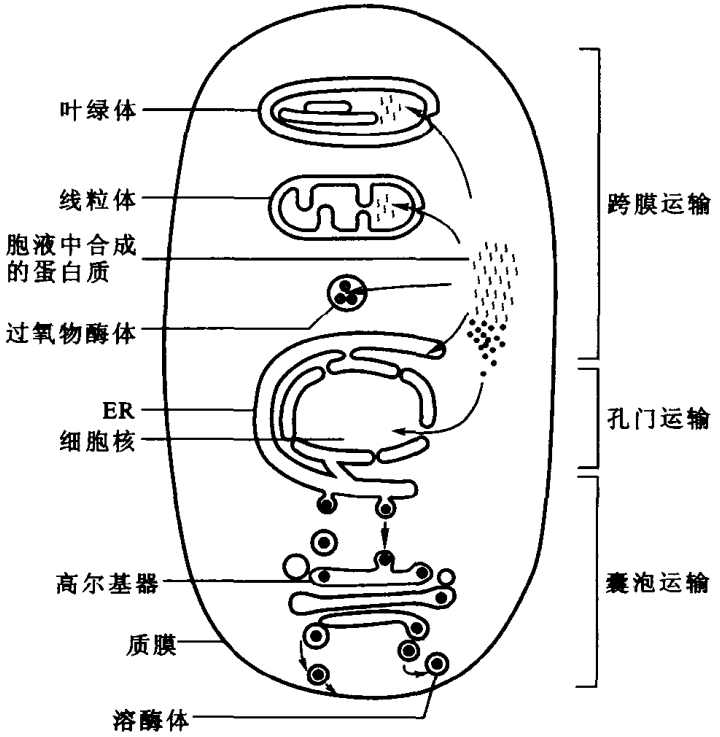


图 4-1 蛋白质运输的 3 种主要途径示意图

在孔门运输途径和囊泡运输途径中蛋白质常保持折叠状态;在跨膜运输途径中蛋白质通常是不折叠的。所有这些过程都需要能量

上述 3 种运输蛋白的途径,一般是通过被运输蛋白中的分选信号进行选择指导,分选信号被靶细胞器上的互补受体蛋白所识别。例如,一种大的蛋白分子被运输到核内,它必须具有为核孔(复合物)上的受体蛋白所识别的分选信号;如果一种蛋白是被直接运输横过膜的

话,它必须具有被横过膜的蛋白转移器所识别的分选信号;同样,如果一种蛋白质被收入某种类型的运输囊泡里,或者被保留在某种细胞器中,它的分选信号必须被相应膜中的互补受体所识别。

4.1.3 两种类型的分选信号

细胞中在蛋白质上至少有两种类型的分选信号。一种类型存在于氨基酸序列的延伸节段。典型的有 15～60 个氨基酸残基长。这种信号肽(signal peptide)一旦完成了分选过程,常通过一种信号肽酶(signal peptidase)从已完成的蛋白上去掉。另一种类型是信号斑(signal patch),是在蛋白质折叠起来时其表面的一些原子特异的三维排列构成的。构成信号斑的氨基酸残基在线形氨基酸序列中彼此相距较远(图 4－2),它们一般是保留在已完成的蛋白中。信号肽通常指导蛋白质从胞液到内质网、线粒体、叶绿体、过氧物酶体和核。它们也经常留在内质网的可溶性蛋白中。信号斑识别由特异糖残基为标志的某些酶,然后指导它们从高尔基器到溶酶体。信号斑也存在于其他还没有很好特征化的分选步骤。

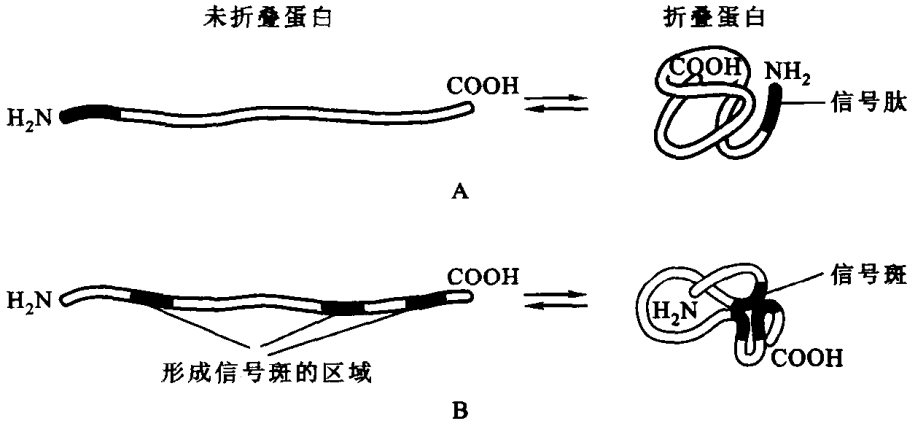


图 4－2 组合在蛋白质中的两种类型的分选信号

A. 信号肽,在单一氨基酸序列的延伸节段,在折叠的蛋白中能露出来,它常存在于多肽链末端,但也能位于别处; B. 信号斑,在蛋白质折叠前,分开的一些区域的氨基酸交叉重叠形成,或者在折叠蛋白质的表面有固定间隔的、分开的斑也能够形成信号。两种情况都是分选信号决定于蛋白质的三维构象(引自 B. Alberts, 等)

信号肽的不同类型用于指导蛋白到细胞的不同目的地。注定开始运输到内质网的蛋白质通常在其氨基端有一信号肽,它的特征是包括一个由疏水氨基酸组成的序列。这些蛋白质的大部分依次经过内质网到高尔基器。但是在羧基端具有 4 个氨基酸特异序列的蛋白质则保留在内质网成为其永久成分。注定到线粒体的蛋白质还有另一种类型的信号肽,其带正电荷的氨基酸与疏水的氨基酸交替排列。注定到过氧物酶体的蛋白通常在其羧基端有特异的 3 个氨基酸信号序列。注定到核的许多蛋白质携带一个由一串带正电荷的氨基酸所形成的信号肽,它一般存在于多肽链的内部位置。一些典型的信号肽列于表 4－1。

这些信号肽的功能已经实验证明。通过遗传工程技术将信号肽从一种蛋白转移到另一种蛋白,结果该信号肽指导蛋白的去向。例如,将氨基端的内质网信号肽置于胞液蛋白合成开始时,使蛋白质改变方向到内质网,即使它们的氨基酸序列很不相同。所有具同一注定目

标蛋白质的信号肽在功能上是可以互换的。在信号识别过程中氨基酸的疏水性比精确的氨基酸序列更重要。

信号斑的分析远比信号肽困难,由于它是从复杂的蛋白质的三维结构形成的,所以在实验上不易将它们从一种蛋白转移到另一种,因此对其结构了解得很少。

表 4-1 一些典型的信号肽

信号肽的功能	信号肽
输入到内质网	$^{+}H_3N$-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Vla-Phe-Gln-
保留在内质网腔	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO^{-}
输送到线粒体	$^{+}H_3N$-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
输送到核	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
输送到过氧物酶体	-Ser-Lys-Leu-

4.2 胞液(细胞质基质)

4.2.1 胞液的概念和组成

细胞质中在细胞器和内含物以外的、较为均质半透明的液态胶状物质称为胞液(cytosol,或译为胞质溶胶,早期称为 cell sap)或称为细胞质基质(cytoplasmic matrix 或 cytomatrix),也称基本细胞质[fundamental(或 basic 或 ground) cytoplasm]或透明质(hyaloplasm)等不同名称。用生化差速离心法除去细胞器和质膜等结构后,其上清液部分为基质成分,生化学者称其为胞液。细胞质基质和胞液,虽有人认为二者不完全相同,但现在一般认为这二者可等同使用。

胞液的主要成分有水、无机离子(如 Na^{+}、K^{+}、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Cl^{-})等小分子,还有脂类、糖类(如葡萄糖、果糖、蔗糖)、氨基酸、核苷酸及其衍生物等中等分子,以及蛋白质、脂蛋白、RNA、多糖等大分子。胞液中含有大量的酶,几乎所有参加蛋白质合成的氨基酸激酶,所有使胸腺嘧啶脱氧核苷掺入到 DNA 中所需要的一些酶,合成核酸所需要的一些酶,以及大部分合成脂肪酸的酶,糖酵解所需要的酶等,还有构成微丝微管的各种蛋白,都存在于胞液中。在胞液中蛋白质的含量占 20%～30%,多数为水分子(约占 70%),是以水化物的形式结合在蛋白质或其他大分子表面的极性部位,仅有部分水分子游离存在,起溶剂作用。

在胞液中的多数蛋白,包括水溶性蛋白,不是以溶解状态存在,而是直接或间接地与细胞质骨架结合,或与生物膜结合。如与糖酵解过程有关的一些酶结合在微丝上,在横纹肌细胞中则结合于肌原纤维的特异位点上。这种特异性的结合与细胞的生理状态、发育和分化程度有关。在卵母细胞中,不同种的 mRNA 定位于胞液的不同部位;非肌细胞中,肌动蛋白的 mRNA 主要分布于胞质外周。胞液中的蛋白质之间或蛋白质与其他大分子之间可能通

过非常弱的键相互作用。如与糖酵解有关的酶彼此间可能以此弱键结合形成多酶复合物，定位于胞液中的特定部位，催化从葡萄糖到丙酮酸的一系列反应。前一个反应的产物即为后一个反应的底物，二者之间的距离仅为几个纳米(nm)。每个反应途径之间可能也以类似的方式互相联系，高效有序地完成各种复杂的代谢活动，代谢途径之间协调一致，以及完成所涉及物质、信息和能量的定向转移和传递等复杂的生命过程。由此也说明胞液是一种高度有序的复杂的结构体系。

4.2.2 胞液的功能

胞液在细胞的物质代谢中起着重要作用。所有的中间代谢(intermediary metabolism)均发生在细胞质中，其中大部分是在胞液中进行的。例如，糖酵解过程，磷酸戊糖途径，核苷酸、脂肪酸和氨基酸代谢的一定阶段，都是在胞液中完成的；糖原的合成与部分分解过程以及蛋白质和脂肪酸的合成也是在胞液中进行的。近年来对胞液中合成的蛋白质分选转运机制的研究取得了重要进展。已证明蛋白质的合成一般起始于胞液，由于其 N 端含有信号序列而被转运到内质网上继续进行蛋白质合成。其他蛋白质的合成在胞液中完成，根据其自身携带的信号不同被分选转运到不同的细胞器，其余的蛋白质驻留在胞液中，成为其结构成分。

胞液的另一功能是与细胞骨架有关。由于构成细胞骨架的蛋白存在于胞液中，因此许多学者认为细胞质骨架为胞液的主要结构成分，它对维持细胞的形态、细胞运动、细胞内的物质运输以及能量传递等有重要作用，也为胞液中的其他成分和细胞器提供了锚定位点；有些学者认为细胞质骨架不属于胞液概念中。但是在胞液中的各种骨架蛋白如微管蛋白约一半组装成微管；一半存在于胞液中。骨架的主要成分(微丝、微管)的聚合组装和解聚去组装与液相中的骨架蛋白经常处于动态平衡中，难以区分。胞液中如果没有骨架的支持和组织，其他许多成分也失去了锚定点，胞液也就不成其为高度有序、复杂的结构体系。因此有些学者对胞液提出了新的解释，认为胞液是由微管、微丝和中等纤维等形成的相互联系的结构体系，其中蛋白质和其他分子以凝集和暂时凝集状态存在，并与周围胶相中的分子处于动态平衡中。

还有，胞液在蛋白质的修饰，控制蛋白质寿命、选择性降解以及协助变性或错误折叠的蛋白重新折叠成正常分子构象等方面，均有重要作用。例如，已发现 100 余种蛋白质的侧链修饰，绝大多数的修饰是由专一的酶作用于蛋白质的特定位点。已知在胞液中进行的蛋白质修饰主要有：辅酶或辅基与酶的共价结合；调节许多蛋白生物活性的磷酸化和去磷酸化；将 *N* - 乙酰葡萄糖胺分子加到蛋白质的丝氨酸残基上的糖基化；对某些蛋白的 N 端进行甲基化修饰(不易被蛋白酶水解)；将软脂酸链共价结合于某些跨膜蛋白露在胞液面的结构域进行酰基化以及癌基因(如 *src* 和 *ras*)产物的酰基化。如 *src* 基因编码的酪氨酸蛋白激酶与豆蔻酸共价结合，这种酰基化的激酶才能转移并以豆蔻酸链与质膜结合，细胞才能被转化。

在控制蛋白质寿命方面，胞液中蛋白质的寿命长短不一，大部分可维持几天，有一些合成后几分钟即被降解。在蛋白质分子的氨基酸序列中有决定修饰的信号，也有决定蛋白质寿命的信号。后一信号位于蛋白质 N 端的第一位氨基酸残基。如果它是甲硫氨酸(Met)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(The)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、半胱氨酸(Cys)、甘氨酸(Gly)或脯氨酸(Pro)，则蛋白质是稳定的；若为其他 12 种氨基酸之一，则为不稳定的。对其控制机制

尚了解不多。已知在真核细胞的胞液中有依赖遍在蛋白的降解途径(或译为依赖泛素途径,ubiquitin - dependent pathway)。遍在蛋白是由 76 个氨基酸组成的,具多种生物学功能。它能识别 N 端不稳定的氨基酸信号,由多个遍在蛋白分子共价结合到不稳定蛋白 N 端氨基酸残基上,然后经一种依赖 ATP 的蛋白酶将蛋白质完全水解。对胞液中变性和错误折叠蛋白或错误修饰的蛋白的降解可能也通过这一降解途径。此外,对协助变性或错误折叠蛋白重新折叠成正常分子,主要是通过热休克蛋白(heat shock protein, HSP)完成的。已有实验证明,在正常细胞中相对分子质量为 9.0×10^4和相对分子质量为 7.0×10^4的热休克蛋白(每一家族中均有由不同基因编码的数种蛋白),特别是相对分子质量为 7.0×10^4的蛋白与畸形蛋白及其聚合物结合,由 ATP 水解释放能量使聚合蛋白溶解并进一步折叠成正常的蛋白质。

4.3 内质网

内质网(endoplasmic reticulum, ER)是由 K. R. Porter 和 A. D. Claude 等(1945)发现的。他们在电镜下观察培养的小鼠成纤维细胞,发现细胞质内有一些形状大小略不相同的小管、小囊连接成网状,集中在内质中,故称其为内质网(图 4 - 3)。此后,由于超薄切片电镜技术的发展,生化超离心技术与电镜工作结合,以及同位素标记电镜放射自显影术、电镜细胞化学、免疫组织化学等技术的应用和改进,特别是 20 世纪 70 年代以来新的物理学技术的应用,对内质网的结构与功能已在分子水平上有了相当深入的认识。它是内膜系统中的重要房室,是蛋白质分选运输途径中不可缺少的一环,是蛋白质从胞液到一些细胞器(高尔基器、胞内体、溶酶体、ER)及质膜的进入点(entry point),即所有这些蛋白首先进入 ER 完成蛋白的合成,再经加工修饰分送到上述的各部分。

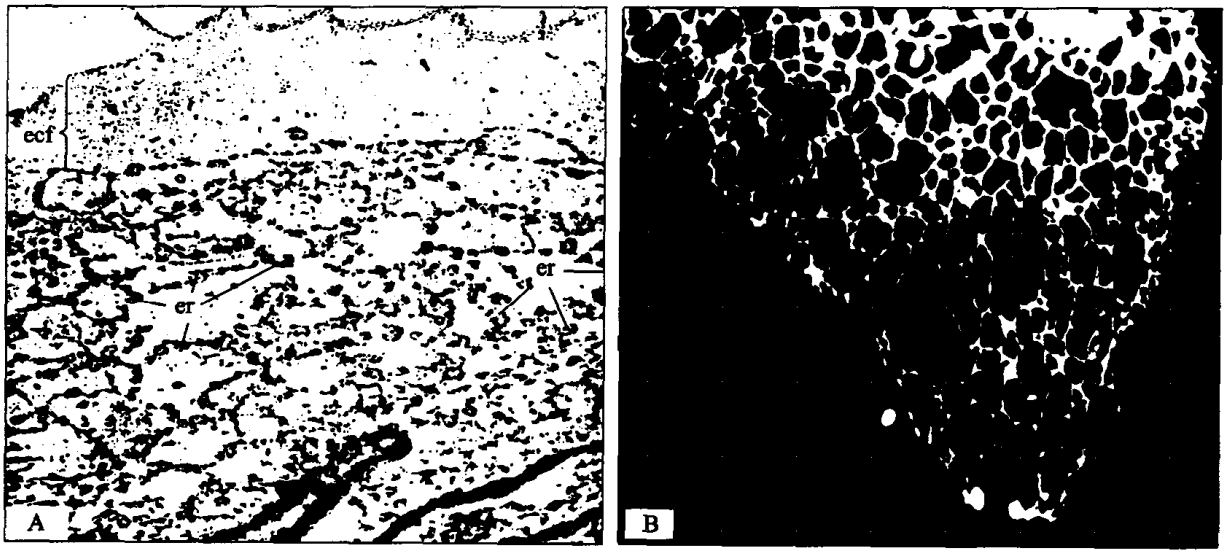


图 4 - 3 内质网的照片

A. 培养的小鼠成纤维细胞边缘区的电镜照片示 er:内质网,ecf:外质,×7 000(引自 K.R.Portor);B. 培养的非洲绿猴肾上皮细胞的内质网荧光镜照片,喹啉蓝染料染色,示内质网,×4 500(中国医科大学宋今丹教授惠赠)

4.3.1　内质网的形态结构和类型

4.3.1.1　内质网的形态结构

内质网是由膜(一个单位膜)所形成的一些形状大小不同的小管、小囊和扁囊[亦称膜层(lamellae),或小池、潴泡(cisternae)]构成的。膜厚约 5～6 nm。在细胞质中常由这些小管、小囊和扁囊连成一个连续的网状膜系统,其内腔是通连的(图 4－4)。有些细胞的内质网只有其中 1 种或 2 种成分,有些细胞则具有这 3 种成分。可以说小管、小囊、扁囊是内质网的"单位结构"(unit structure)。内质网在细胞质中一般呈连续的网状存在,这一点已为实验观察所证实,但这种连续性和形状不是固定不变的。在细胞生活中一个时期可能是一些连续小管、小囊,而在另一个时期又可能是不连续的。内质网对细胞的生理变化相当敏感,在不正常或服药的情况下,如饥饿、缺氧、辐射、胆碱缺乏,或患肝炎、黄热病,或服用激素、某些药物(如四氯化碳、乙基硫氨酸等),均可使肝细胞的 ER 囊泡化(vesiculation)。

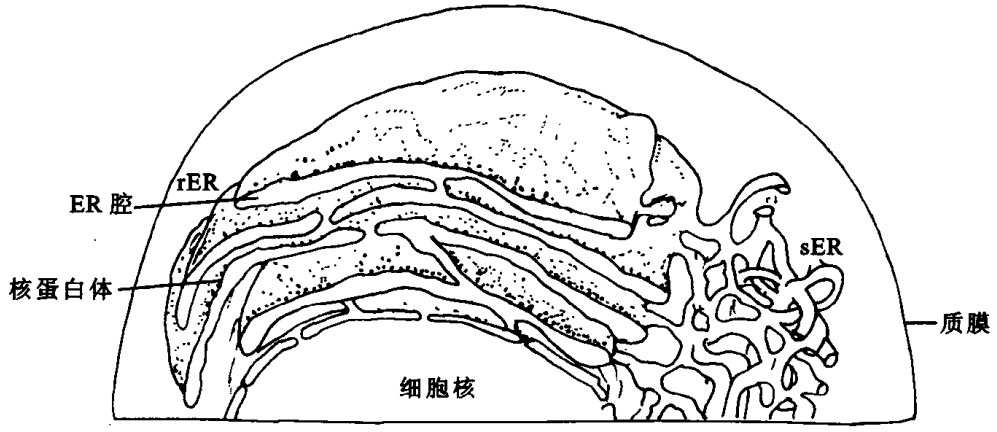


图 4－4　内质网立体结构示意图

内质网膜和外层核膜是连续的,ER 内的腔与两层核膜中间的腔相通连,这种通连是恒定的。有人将内质网、核膜和高尔基器统称为液泡系统(vacuolar system)。内质网和质膜是不连续的。在不同细胞中 ER 的形态、数量和分布不同,在一个细胞内不同的细胞质区域也常不一样;即使同一种细胞不同发育时期,随着生理机能的不同,ER 也不一样。例如,卵细胞、胚胎和未分化的细胞,ER 往往比较小,相对不发达;随着细胞分化,ER 的大小和形态复杂性越来越增加。但是在各类型的成熟细胞,ER 有一定的形态特征。在不同动物的同一类型细胞中 ER 的形态也有某种程度的相似。只要这些细胞的机能相似,ER 就非常相似,如合成分泌类固醇的细胞及分泌蛋白质细胞的 ER。

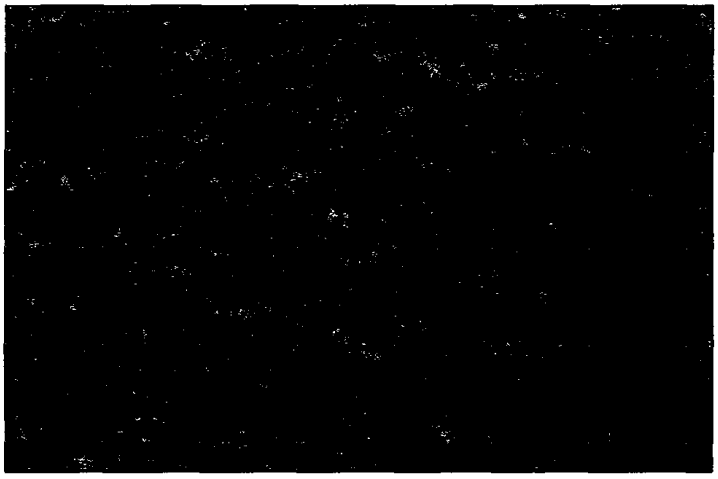
4.3.1.2　内质网的主要类型

根据 ER 的形态结构,主要分为两种类型。

1. 糙面内质网(rough endoplasmic reticulum, rER,或称粗面 ER 或颗粒型 ER)

主要特点是在 ER 膜的外表面附有颗粒,此为核蛋白体(ribosome,或称核糖体或核糖核蛋白体),它由一大一小 2 个亚基组成,主要成分是 RNA 和蛋白质,为蛋白质合成的主要部位。核蛋白体附着的膜系多为扁囊(小池)单位成分(图 4－5),有时可见扁囊内的物质积累

而使其膨大,普遍存在于分泌蛋白质的细胞中,其数量随细胞而异,越是分泌旺盛的细胞中越多。如胰腺细胞中,ER 占整个细胞质体积的 3/4,在肝细胞中,据实验估计 1 mL 肝细胞包含的 ER 膜表面积约有 11 m^2 其中 2/3 为 rER。



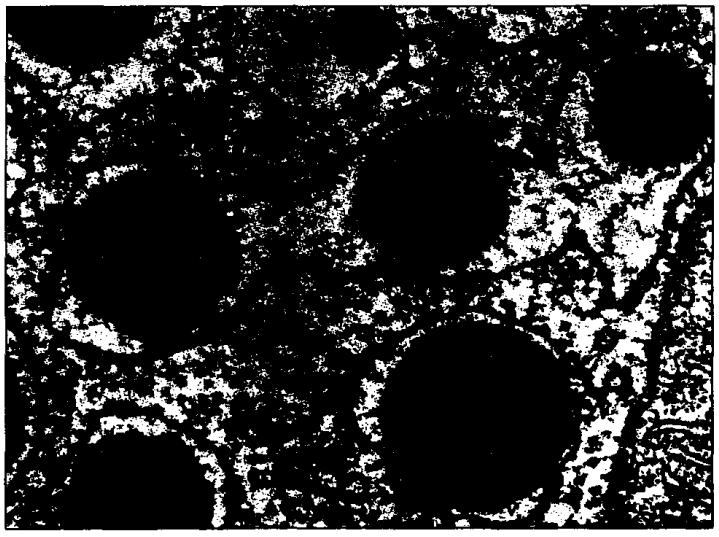


图 4-5 rER 电镜照片
A. 狗的胰腺外分泌细胞的 rER 的一部分,在 ER 的胞液面附有很多核蛋白体; B. 天竺鼠胰腺外分泌细胞的 rER 的一部分,示 rER 膨大呈小池,其中大的致密颗粒,可能是蛋白质积累在 ER 小池内。×50 000(A 引自 L. Orci;B 引自 G. E. Palade)

核蛋白体除了结合于 ER 膜表面外,许多则游离于细胞质中。在胞液中有共同的核蛋白体库,用于合成保留在胞液中或运输到 ER 的蛋白质(图 4-6)。结合膜的核蛋白体和游离的核蛋白体在结构和功能上是相同的,不同点在于在核蛋白体上产生的蛋白质是否具有 ER 信号肽。如果在胞液的核蛋白体上开始合成具 ER 信号肽的蛋白质,此信号肽便指导核蛋白体到 ER 膜。由于许多核蛋白体能结合到一个 mRNA 分子,形成多核蛋白体(polyribosome),通过生长的多肽链的信号肽结合于 ER 膜上(图 4-7)。如果在胞液中核蛋白体合成的蛋白质不具信号肽,蛋白质合成后则保留在胞液中。在 ER 核蛋白体上合成的蛋白质有 2 类:①形成跨膜蛋白,即合成的蛋白质部分转移横过 ER 膜,并埋于膜中成为跨膜蛋白。有些跨膜蛋白留在 ER 膜;有些则保留在质膜或其他细胞器的膜内。②合成水溶性蛋白,能完全转移横过 ER 膜释放到 ER 腔。这些蛋白注定到细胞器的腔或分泌出细胞。

如血浆蛋白(包括抗体)、酶原或肽类激素等。所有这些蛋白不论其后来命运如何,都是通过同一种信号肽指导到 ER 膜,并通过相同的机制转移横过膜。游离的核蛋白体合成核基因组编码的所有其他蛋白质(包括酶),也合成某些特殊蛋白如红细胞中的血红蛋白。未分化的细胞如原血细胞以及蛋白质代谢旺盛的细胞,游离的核蛋白体较多。因此分裂活动旺盛的细胞,游离核蛋白体的数量也多,且分布均匀。正常细胞癌变时游离核蛋白体增多,ER 及结合 ER 的核蛋白体数量相对减少。所以游离核蛋白体的量可用作诊断癌瘤细胞的指示之一。

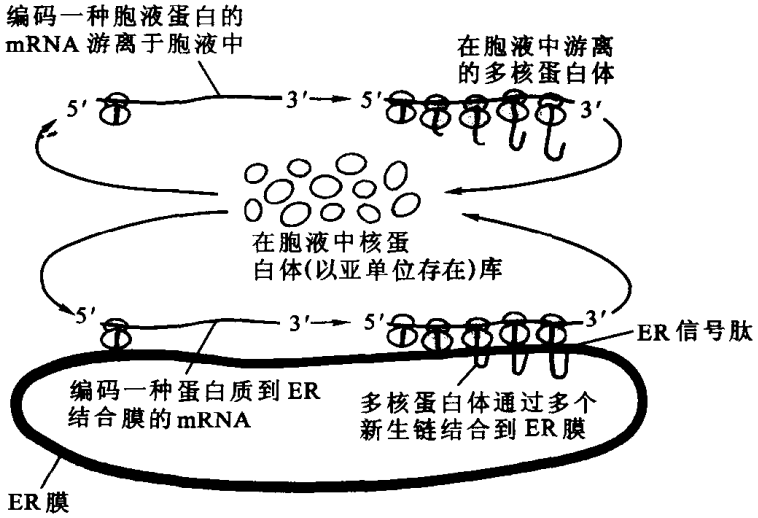


图 4－6　游离的和结合 ER 膜的核蛋白体示意图

共同的核蛋白体库用于合成留在胞液或输送到 ER 的蛋白质。在新合成的多肽链上的 ER 信号肽指导核蛋白体到 ER 膜。mRNA 分子作为多核蛋白体的部分可保留结合到 ER。每一轮蛋白质合成结束,核蛋白体亚单位被释放,并重新加入胞液的共同核蛋白体库中(仿 B. Alberts, 等)

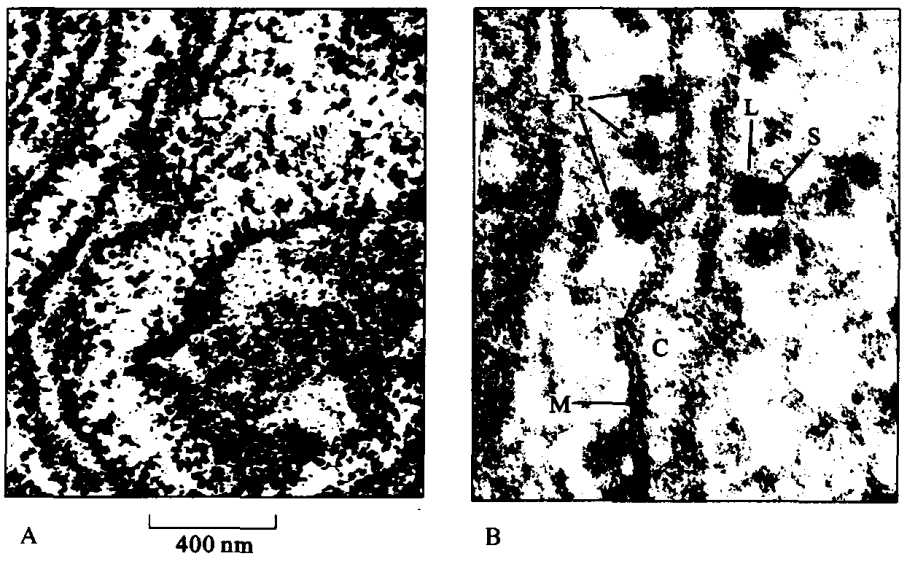


图 4－7　结合于 ER 膜的多核蛋白体电镜照片

A. 薄切片,有的切面大体平行于 ER 膜,显示的多核蛋白体如玫瑰花形; B. 天竺鼠肝细胞薄切片电镜照片的一部分(R: 核蛋白体, S: 小亚基, L: 大亚基, M: ER 膜), ×275 000(A 自 G. Paladc; B 自 D. D. Sabatini, 等)

2. 光面内质网(*smooth endoplasmic reticulum*, sER, 或称无颗粒型 ER)

这一类型的主要特点是 ER 膜光滑,无核蛋白体。ER 的单位成分不是扁囊,而常为小管小囊成分。小管直径为 50～100 nm,它们连接成网,广泛存在于能合成类固醇的细胞。

如精巢的间质细胞、肾上腺皮质和其他分泌固醇类激素的细胞(图 4－8)。在肝细胞,ER 的小管成分开始于扁囊的边缘,构成一个不规则的小管网遍布于泡液中,其间常见有糖原。大多数细胞的 sER 是不多的,仅有一小区域的 ER,部分光滑部分粗糙,这个区域是由转移成分(transitional elements)构成的,因为从这携带新合成的蛋白和脂类的运输囊泡出芽、脱落,输送到高尔基器(图 4－9)。此外,横纹肌的 ER 为 sER,呈一特殊网形,平滑肌的 ER 也为 sER。植物细胞的 sER 多沿着细胞表面集中在细胞壁形成的区域。看来 sER 是一种多机能性的结构,对不同机能的形态特征及其差异本质尚不甚了解。

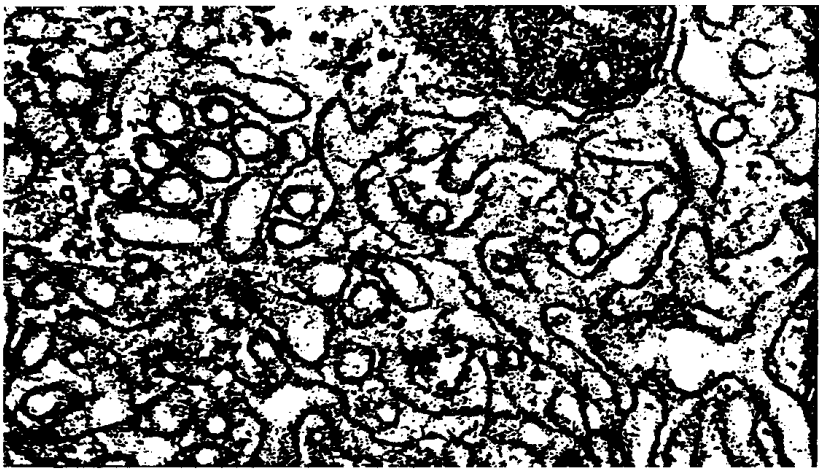


图 4－8 人睾丸的间质细胞的一部分电镜照片示 sER(引自 B. Alberts, 等)

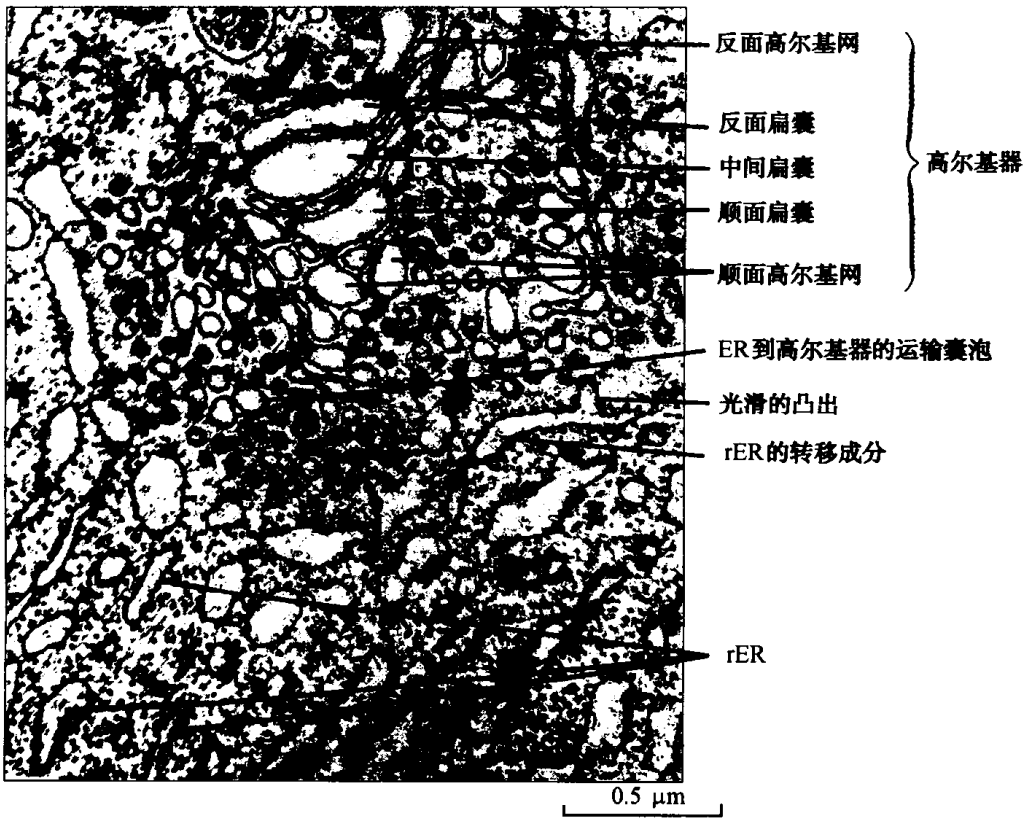


图 4－9 胰腺外分泌细胞的 ER 和高尔基器电镜照片示 ER 的转移成分(引自 G. Palade)

此外，尚有其他类型的 ER。如髓样体(myeloid body)，主要存在于视网膜的色素上皮细胞中，由 sER 的小管小囊连接成网形，在网的一些部位有一些膜层紧密平行排列成双凸透镜形的小体(称髓样体)，可能依赖光的刺激进行功能活动；还有环状片层(annulate lamellae)，常出现在生殖细胞、快速生长的细胞或病理上分化的细胞(包括一些癌细胞)，以及某些哺乳动物的神经元和松果体细胞等。其形态结构很像核膜的片段，相当于薄的带孔的 ER 扁囊，常平行排列成堆，在扁囊上有与核膜同样的孔复合物。这种类型 ER 多存在于细胞质中，与 rER 相连续，也有的存在于核中与核膜内面和核仁相联系，可能对核内外的物质运输有作用，或认为它在 RNA 和核蛋白体加工的某阶段有作用，对其功能尚了解不够，有待进一步研究。

4.3.2 内质网的功能

为了研究 ER 的功能，常需要分离 ER 膜。用离心分离方法将组织或细胞匀浆，经低速离心去除核及线粒体后，再经超速离心，破碎 ER 的片段又封合为许多小囊泡(直径约 100 nm)，是为微粒体(microsome)。用密度梯度离心分离出来自 rER 或来自 sER 的微粒体，以及分离出高尔基器等。对 rER 微粒体，如加上脱氧胆酸钠(Na deoxycholate, Na DOC)可去除膜，留下核蛋白体，这样对核蛋白体可进行深入的生化分析；如果加上 RNase 则可将核蛋白体的 RNA 溶去，只剩下膜，由此可进一步研究膜的化学成分。由于微粒体就是生活细胞的 ER，微粒体囊泡的内部相当于 ER 腔，rER 微粒体的核蛋白体总是在其外面，仍能进行蛋白质合成、蛋白质糖基化和脂类合成等，通过微粒体研究 ER 的功能已取得许多有价值的结果。

ER 在细胞生活中有着多种重要功能。它对细胞的多种重要蛋白(包括酶)的合成、修饰加工、转运或输出细胞以及对几乎全部脂类的合成都起着重要作用。ER 膜是大部分细胞器(包括 ER、高尔基器、溶酶体、胞内体等)以及质膜的所有跨膜蛋白和脂类合成的场所。几乎所有外分泌蛋白及注定到 ER、高尔基器、溶酶体和胞内体腔的可溶性蛋白开始时也送到 ER 腔。此外，ER 与糖类代谢、解毒作用等都密切相关，其中 sER 和 rER 的功能不同。

4.3.2.1 蛋白质的合成、加工修饰和转运

1. 蛋白质的合成和转移

蛋白质的合成一般开始于胞液中的核蛋白体上，但是，在胞液中开始合成的蛋白质如何到 ER 膜上？在 20 世纪 70 年代早期 Günter Blobel、David Sabatini 和 Bernhard Dobberstein 提出，蛋白质合成的位置是由其 N 端氨基酸序列决定的。他们认为：①分泌蛋白在 N 端含有一信号序列，它指导刚出现的多肽和核蛋白体到 ER 膜；②多肽正在合成时通过 ER 膜上的水通道进入 ER 腔。这就是信号假说(signal hypothesis)，已为很多人的多种实验所证实。除了对分泌蛋白和有关 DNA、mRNA 的序列分析外，通过重组 DNA 技术将信号序列连接到正常的不具信号肽的蛋白，结果连接信号肽的蛋白被指导到 ER 膜。这为信号假说提供了更准确的验证。

如图 4－10 所示，多肽的合成是从 mRNA 结合到游离的核蛋白体开始。核蛋白体与在胞液中合成蛋白的一样，均来自于胞液中共同的核蛋白体库。结合 ER 膜的核蛋白体在合成多肽时，在多肽的 N 端含有一信号序列(signal sequence，或信号肽)——为 18～30 个非极性氨基酸残基构成，它指导新生多肽到 ER 膜。当信号序列从核蛋白体上一出现，就被信号

识别颗粒(signal recognition particle, SRP)所识别。SRP 存在于胞液中,由 6 个不同的多肽亚单位和一个小的 RNA 分子组成,为一种 GTP 结合蛋白(GTP - binding protein)。SRP 结合到新生多肽的信号序列和核蛋白体,阻碍了多肽链进一步合成,此时翻译停止,直到 SRP 复合物(SRP、核蛋白体、新生多肽)结合到 ER 膜。此时至少发生两个结合:①SRP 和膜上的 SRP 受体(SRP receptor)结合;②核蛋白体和 ER 膜上转移器(translocon 或 translocator 或 translocation apparatus)相互作用。一旦核蛋白体牢固结合于 ER 膜,新生肽链含信号肽的一端插入到转移器的通道,信号肽结合到转移器内的一个位点,触发打开到 ER 腔的通道;接着 SRP 从 ER 膜的 SRP 受体上释放,翻译、转移继续,多肽链通过转移器到 ER 腔;转移结束,结合膜的核蛋白体被释放,膜的通道关闭。

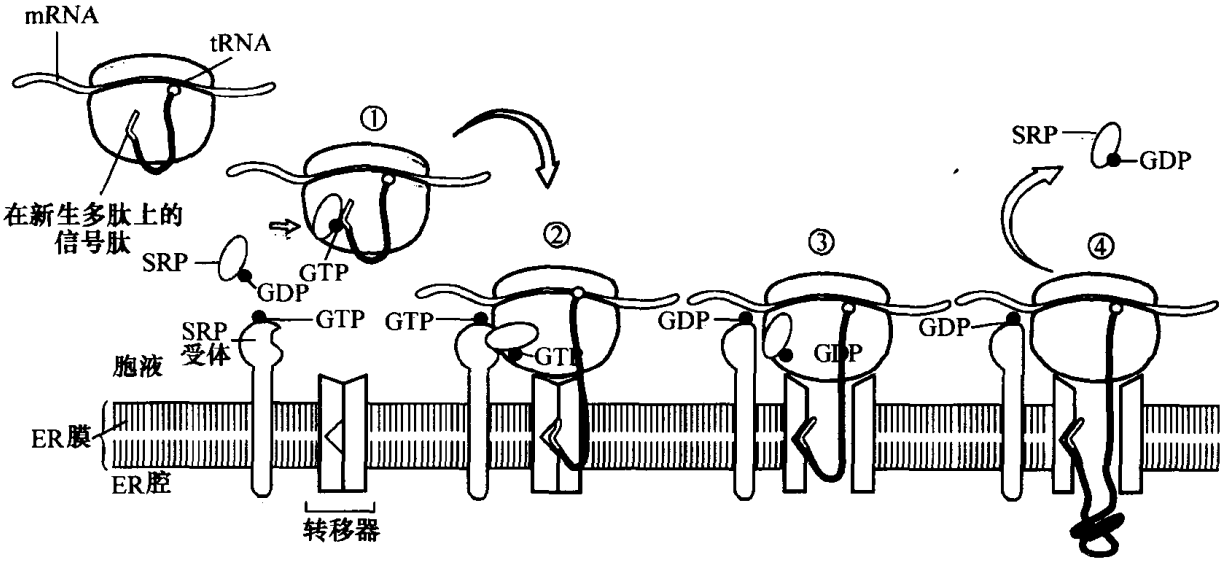


图 4 - 10 在结合膜的核蛋白体上合成分泌蛋白(或溶酶体酶蛋白等)示意图

多肽链合成开始在游离的核蛋白体上,当信号肽从核蛋白体上一出现,被 SRP 识别并与 SRP 结合(步骤①),翻译停止,直到接触到 rER 膜,核蛋白体附着于 ER 膜(步骤②)是由 SRP 受体和转移器介导的。随后,信号肽(以成环的构型)结合到转移器的成分,打开通道到 ER 腔(步骤③),SRP 从其受体上释放,多肽链通过通道转移(步骤④)。这些步骤中 GTP 结合和水解的作用(见文内所述)。新生多肽链进入 ER 腔后,信号肽被信号肽酶(signal peptidase)切除(仿 G. Karp, 1999)

上述蛋白质合成的一些步骤是由结合和水解 GTP 来调节。GTP 结合蛋白(或称 G 蛋白)在许多不同细胞过程起重要调节作用(详见第 10 章),它们存在两种不同构象:活化的是 GTP 结合的形式;钝化的是 GDP 结合的形式。G 蛋白的作用像分子开关,能打开或关闭特异过程。如 SRP 受体与 SRP 同样也是一种 GTP 结合蛋白,在它与 SRP 相互作用以前是与 GTP 结合状态。GTP 的作用像一个分子"搭配接合物"("matchmaker"),使在胞液中组装的翻译复合物(translation complex)与存在于 ER 膜上的转移复合物(translocation complex)相互作用;随后,结合到 SRP 和 SRP 受体的 GTP 分子水解,促使 SRP 从膜上释放,它的作用启动了新生肽链通过膜的转移。

结合膜的蛋白合成的全过程能用纯化的 ER 膜或人工囊泡(脂质体)及纯化的 rER 蛋白在体外研究。应用这一系统或其他实验已证实,在 rER 膜上存在蛋白转移器的通道。过去用电生理学的方法能检测出来,现在用分子探针来测量,已知转移器内水通道的直径为

4～6 nm。有人认为 ER 膜上转移器以两种状态存在——有活性和无活性状态。结合 ER 信号肽时，转移器是活性状态，形成一水孔，转移多肽链横过脂双层；但在多肽完全转移之后，则呈无活性构象，孔关闭。

以上所述的生长的多肽链通过 ER 膜，是随着翻译同时转移至 ER 腔内，这样的转移方式称为协同翻译的转移(co－translational translocation)。结合到 ER 膜的核蛋白体，利用蛋白质合成的能量迫使其生长的多肽链穿过转移器的通道。但是最近的研究表明，有少数小的蛋白前体，在它们合成完成之后也能转移到 ER，这说明转移作用不是都需要继续进行翻译。翻译后蛋白转移在酵母细胞横过 ER 膜及细菌质膜均较为普遍。由于以翻译后转移途径(posttranslational translocation pathway)的蛋白质首先释放到胞液中，它们与胞液中的“伴娘”蛋白(chaperone protein)结合而防止了折叠。蛋白通过膜的转移需要 ATP 水解提供能量，在细菌也需电化学梯度。从纯化的细菌成分已能重新构建转移器，其成分之一是 ATP 酶，一般认为由它协助蛋白穿过膜。

在大部分可溶性蛋白转移后 ER 信号肽被去除。可溶性蛋白的信号肽几乎总是处在蛋白的 N 端，它除了指导核蛋白体到 ER 膜外，还作为一个开始转移信号(start－transfer signal)，有打开转移器孔的功能。当蛋白质的其余部分连续穿过膜呈一个大的环时，信号肽仍结合在转移器。一旦蛋白的羧基端通过膜，由 ER 腔面的信号肽酶的作用将信号肽切除，从转移器孔释放出来，进入 ER 腔，很快被其他蛋白酶降解成氨基酸(图 4－11)。

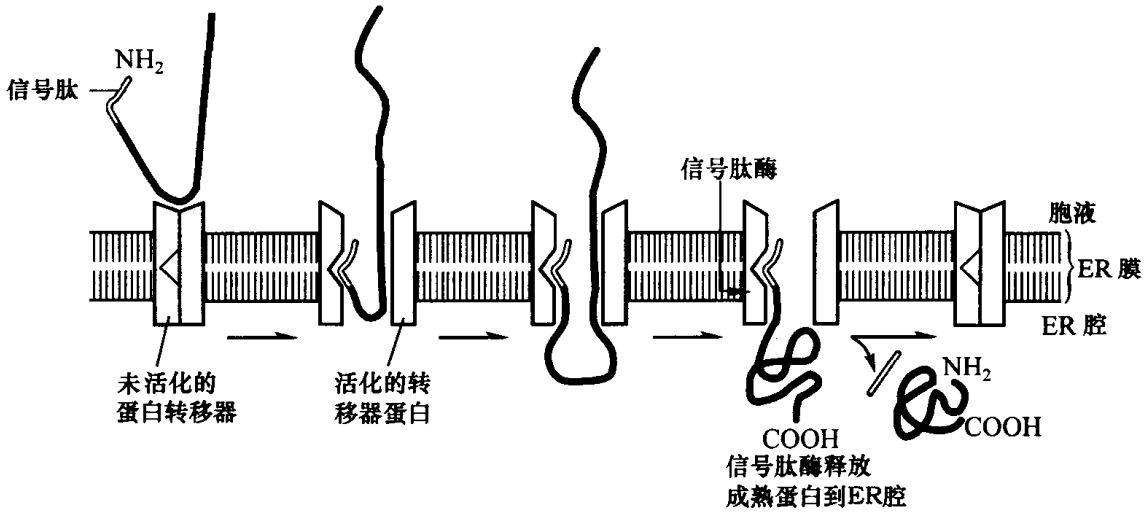


图 4－11　可溶蛋白转移横过 ER 膜进入 ER 腔

蛋白转移器孔结合信号肽并转移多肽链的其余部分横过脂双层成环形。在转移过程的一定时候转移器孔侧向打开，信号肽被信号肽酶切除，转移的多肽链被释放到 ER 腔(略去结合膜的核蛋白体)

2．转移的蛋白质整合到 ER 膜

进入 ER 的蛋白不是所有的全释放到 ER 腔，有些则留在 ER 膜中。留在 ER 膜内的蛋白转移过程比可溶蛋白的转移复杂。单次跨膜蛋白插入 ER 膜，通过一种较简单的机制是新生肽链协同翻译的插入(co－translation insertion)。在新生跨膜蛋白的肽链中既有 N 端的信号肽，又有停止转移肽(stop－transfer peptide 或 halt transfer peptide)，也称为停止转移信号(stop transfer signal)，它也是肽链中的疏水节段。N 端的 ER 信号肽给予开始转移信

号，肽链续继转移，当停止转移信号进入转移器并与其结合位点相互作用，转移器成为钝化状态。整个多肽链尚未被全部转移以前停止转移过程，ER 信号肽从转移器释放去除；而停止转移肽则留在膜中成为单次 α 螺旋的跨膜节段，其蛋白的 N 端在膜的腔内侧，C 端在胞液侧。另一种机制是，信号肽不是在蛋白的 N 端，而是在肽链的内部，称为内信号肽(internal signal peptide)。它像 N 端信号肽那样被 SRP 识别，并携带正在合成蛋白的核蛋白体到 ER 膜，又作为开始转移信号启动蛋白的转移，多肽链被转移，从转移器释放。当内信号肽即内开始转移肽(internal start－transfer peptide)到达转移器时，则内信号肽保留在脂双层成为单次跨膜的 α 螺旋。内信号肽能以两个不同的方向结合到转移器。内信号肽插入的方向决定于蛋白带电荷的氨基酸节段在内信号肽之前或在其后的分布，它决定跨膜蛋白的羧基端在 ER 腔面、N 端在胞液面或者与之相反(图 4－12)。

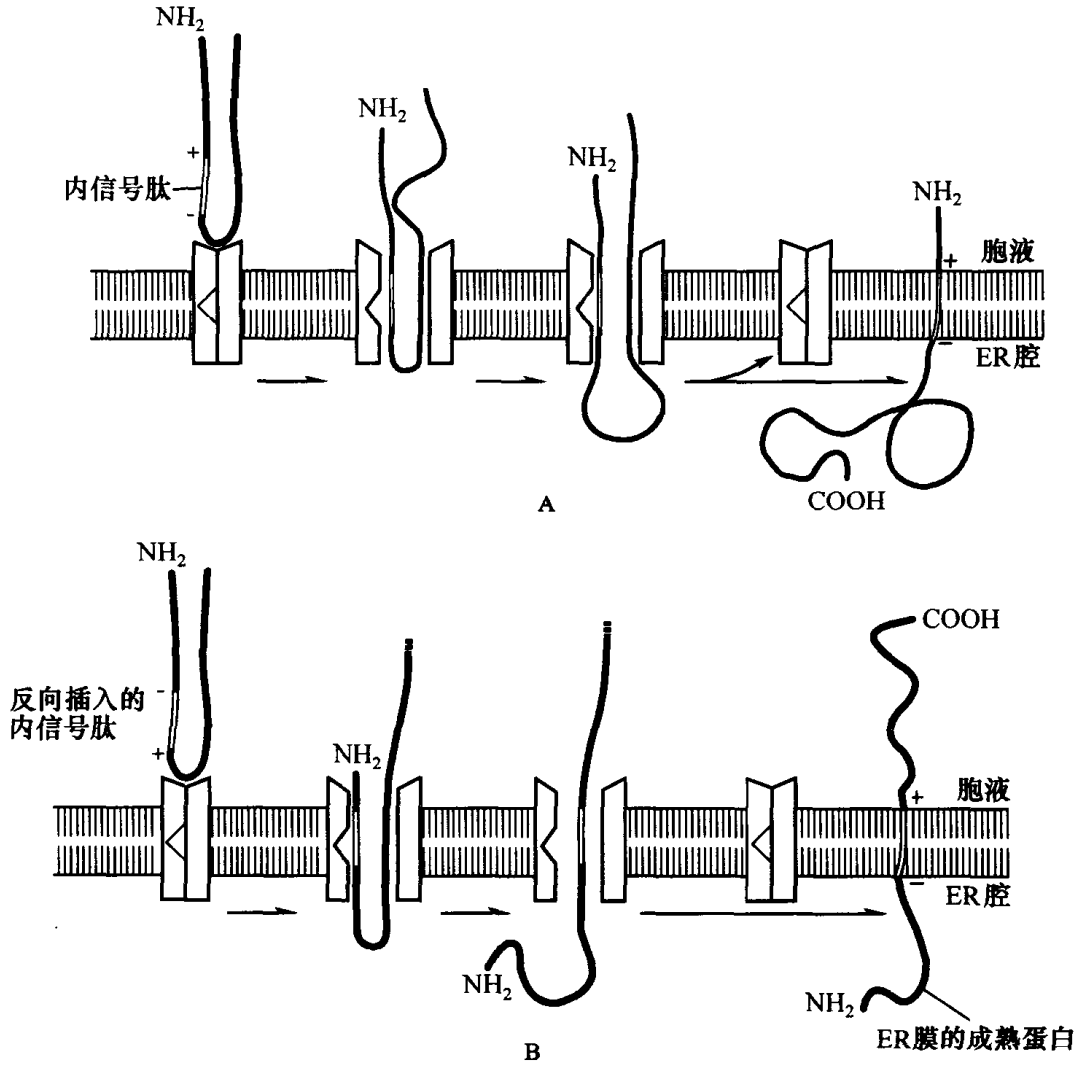


图 4－12 具内信号肽的单次跨膜蛋白整合到 ER 膜示内信号肽插入到转移器的方向

A. 内信号肽的疏水核心之前比其后(C 端)有更多带正电荷的氨基酸，则内信号肽插入转移器的方向为 C 端在 ER 的腔面，带更多正电荷的 N 端留在胞液面；B. 内信号肽的疏水核心之后比在其前(N 端)有更多带正电荷的氨基酸，则内信号肽的方向以 N 端在 ER 腔面，带更多正电荷的 C 端留在胞液面

多次跨膜蛋白整合到 ER 膜比单次跨膜蛋白的转移过程更复杂。它是多肽链前后来回地重复通过脂双层。一般认为内信号肽作为蛋白开始转移信号启动肽链的转移作用，继续转移直到一个停止转移信号到达，才停止转移。内信号肽和停止转移肽均整合在膜内，如双次跨膜蛋白(图 4－13)。在多次跨膜蛋白，当第 2 个开始转移肽出现，又开始多肽链进一步转移，直到下一个停止转移肽引起多肽的释放。这样，有些跨膜蛋白具 2 个以上的开始转移肽和 2 个以上的停止转移肽，如此，开始转移肽和停止转移肽在肽链中多次出现，使跨膜蛋白在翻译完成前多次横过膜，成为多次跨膜蛋白。一个疏水信号序列的功能是开始转移信号还是停止转移信号，决定于其在多肽链中的位置。通过重组 DNA 技术改变它在蛋白中的位置，结果其功能也被转变。可见，开始转移肽和停止转移肽的差别主要是其在生长多肽链中的相对顺序不同。看来 SRP 开始扫描未折叠的多肽链氨基端的疏水节段，并向前进行到 C 端(蛋白质合成的方向)，通过识别第一个从核蛋白体上出现的疏水序列，SRP 形成“阅读框”(“reading frame”)：如果转移作用被启动了，则下一个疏水节段将被识别为停止转移肽，并引起中间的多肽链穿过膜，同样地继续扫描过程，直到蛋白上的所有疏水节段均插入 ER 膜内。

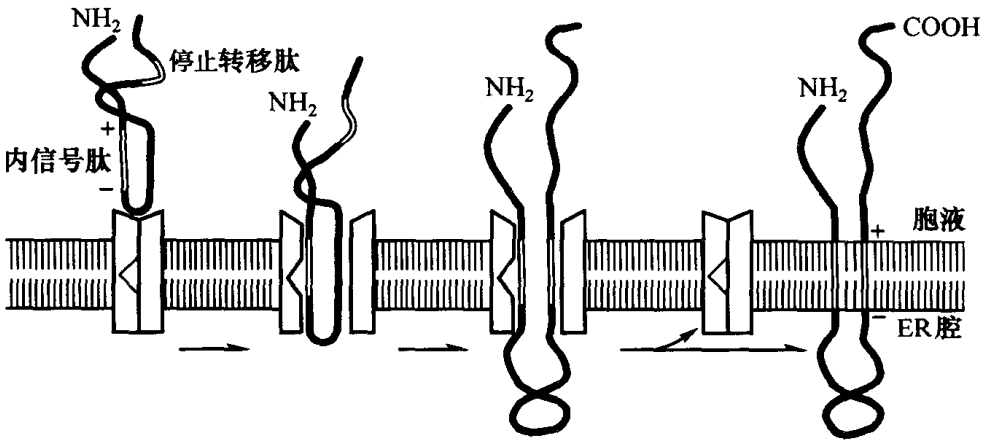


图 4－13　具内信号肽的双次跨膜蛋白被整合到 ER 膜

一个内信号肽作为开始转移信号启动了多肽链 C 端臂的转移，当一停止转移肽进入转移器，它侧向放出蛋白到膜中

3．转移多肽链到 ER 腔内进行加工修饰

已转移到 ER 腔内的多肽链在 ER 腔里进行折叠和组装。在 ER 腔里有许多蛋白质是去其目的地的途中，暂时经过的。但是也有呈高浓度存在的驻留在 ER 腔的蛋白，这些 ER 驻留蛋白(ER－resident protein)为什么能驻留在 ER 腔内不被送往细胞其他部位？因为它含有 ER 保留信号(ER－retention signal)，即在蛋白质的 C 端有 4 个氨基酸(-Lys-Asp-Glu-Leu-COO^-)负责保留蛋白在 ER 腔中。如果这种 ER 保留信号用遗传工程方法去除了，则此蛋白就被分泌出去；如果这信号被转移到分泌蛋白，这蛋白便保留在 ER 腔中，ER 驻留蛋白中，有一些蛋白的功能是作为催化剂，协助转移 ER 腔的许多蛋白，进行正确地折叠和组装。例如，一种 ER 驻留蛋白是“伴娘”蛋白(chaperone protein)，通称为结合蛋白(binding protein，Bip)。在细胞中这类蛋白能识别正在合成的多肽或部分折叠的多肽，并与多肽的一定部位相结合，帮助这些多肽的转移、折叠或组装，但其本身并不参与最终产物的形成，只是

陪伴而已，故得名。这一类分子也称为分子“伴娘”(molecular chaperone)，前面述及的信号识别颗粒(SRP)就是一种分子“伴娘”。ER 驻留的这种“伴娘”蛋白的结构与热休克蛋白中 HSP 70 家族的蛋白有关。ER 中的 Bip 可以识别不正确折叠的蛋白或未组装好的蛋白亚单位，Bip 像其他“伴娘”蛋白一样，结合到暴露的氨基酸序列，这些序列在正常折叠和组装的蛋白中是被埋在里边，结合 Bip 阻碍了蛋白质聚集，并帮助它们重新折叠或组装(图 4－14)。Bip 能水解 ATP 提供其作用于蛋白折叠所需的能量。一旦这些蛋白形成正确的构象或组装完成就与 Bip 分离，进入高尔基器中。

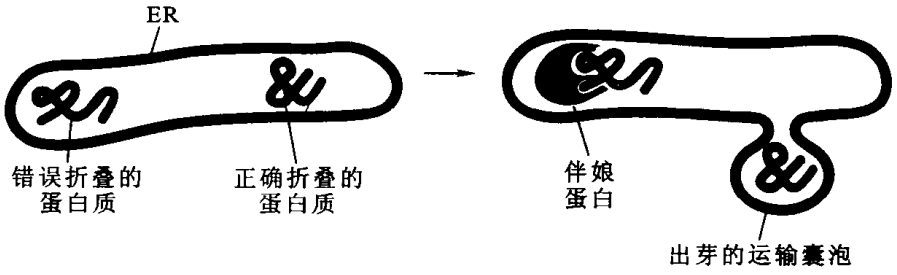


图 4－14 在 ER 中对蛋白的质量控制

在 ER 腔中错误折叠的蛋白质结合到伴娘蛋白，并因此被保留，正常折叠的蛋白质在运输囊泡中被输送到高尔基器；如果错误折叠的蛋白未能正常地再折叠，它们便被运输到胞液被降解(自 B. Alberts, 等)

像 HSP 70 家族的蛋白能结合胞液中未折叠的蛋白质并帮助其输入到线粒体和叶绿体，ER 中的 Bip 也能结合翻译后转移的蛋白未折叠链帮助它们进入 ER，这一过程对翻译后转移途径的蛋白(如酵母细胞横过 ER 膜、细菌质膜)特别重要。由于 Bip 水解 ATP 提供能量，解决了这一类蛋白质通过转移器的动力问题。

另一种 ER－驻留蛋白是蛋白二硫异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)。它催化游离的硫氢基团(SH)氧化形成二硫键(S－S)。几乎所有的在分泌和内吞途径中细胞外或细胞器腔露出的蛋白结构域的半胱氨酸残基都是二硫键。二硫键的形成对蛋白质构象起稳定作用，是蛋白表现生物活性所必需的。但在许多情况下，二硫键可以选择性地被还原，比如露在胞液中蛋白的半胱氨酸残基不形成二硫键，因为在该处为还原的环境。这表明，某些二硫键是生物活性所必需，而另一些二硫键则不是生物活性所必需的。

二硫键的形成是对蛋白质的一种修饰，进入 ER 腔的蛋白质发生的主要化学修饰还有糖基化、羟基化和酰基化等。以下重点介绍蛋白的糖基化。

4. 进入 ER 腔内的蛋白质进行糖基化

在 ER 合成的多肽链进入 ER 腔后，大部分可溶蛋白或结合膜的蛋白质，包括那些注定到高尔基器、溶酶体、质膜或细胞外空间的蛋白都需要进行糖基化，形成糖蛋白。一些糖共价地结合到蛋白质上是 ER 的主要生物合成功能之一。在胞液中，游离核蛋白体所合成的可溶性蛋白不进行糖基化。在 ER 腔里连接到蛋白质的寡糖主要的是由 *N*－乙酰葡萄糖胺、甘露糖和葡萄糖组成的，这种寡糖总是与蛋白质的天冬酰胺残基侧链上的氨基基团连接(图 4－15)。这些 *N*－连接的寡糖(*N*－linked oligosaccharides)只是在 ER 腔中才加到蛋白质上。*N*－糖基化是在 ER 腔面通过结合膜的寡糖转移酶(oligosacharyl transferase)催化完成的。寡糖在 ER 腔的合成和加工是通过多萜醇(dolichol)的介导作用。几乎是当新生肽链

一出现在 ER 膜内表面，整个预先形成的寡糖就被转移到天冬酰胺的残基上(图 4－16)。在 ER 膜的寡糖转移酶，一个拷贝结合一个蛋白转移器。连接脂类的前体寡糖是通过高能的焦磷酸键连到多萜醇。高能键提供糖基化反应的能量。整个寡糖在转移到蛋白以前是在结合膜的脂类分子上一个个糖组装的。这些糖在胞液中首先通过核苷酸－糖中间物(nucleotide－sugar intermediates)的形成被活化，然后它将糖依次移给脂类。通过这一过程，连接寡糖的脂类从 ER 膜的胞液面翻转到腔面(图 4－17)。

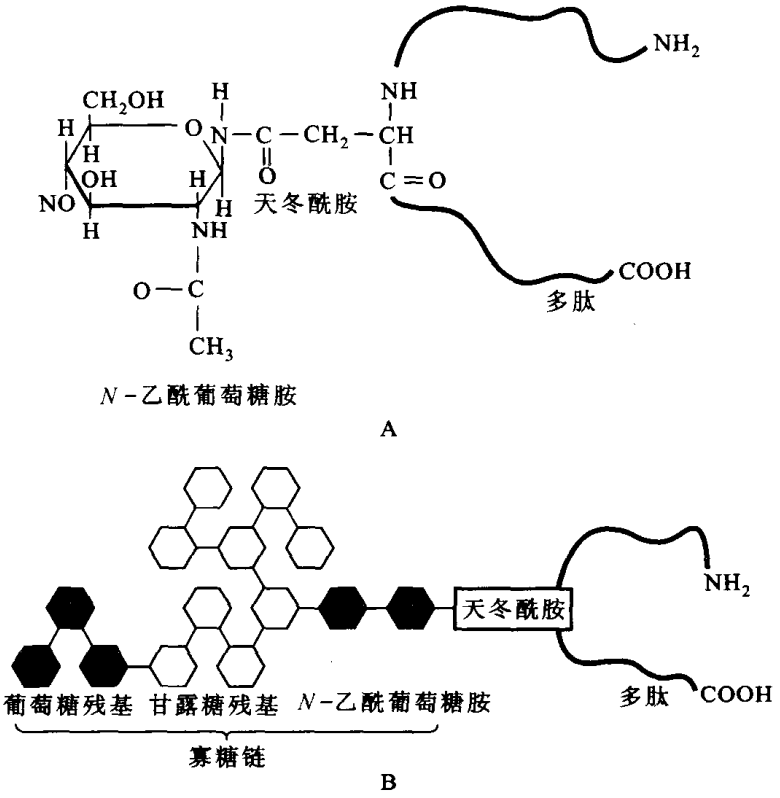


图 4－15　N－糖基化的蛋白质
A. 寡糖的第 1 个糖连到从多肽突出的一个天冬酰胺侧链的氨基基团上；B. 在 rER 腔内 N－糖基化蛋白的寡糖是由 N－乙酰葡萄糖胺、甘露糖和葡萄糖残基组成的

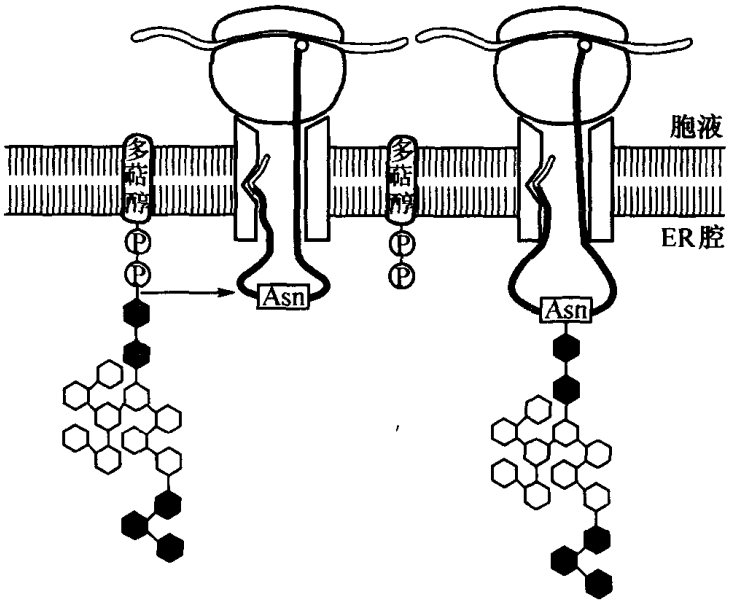


图 4－16　在 rER 腔内蛋白质的糖基化作用
寡糖在结合膜的脂类分子多萜醇上合成第一个糖残基，通过焦磷酸连接到多萜醇。生长的多肽链的天冬酰胺残基通过膜的蛋白转移器，由糖基转移酶的催化，已完成的寡糖链从脂类上转移，与氨基酸共价结合

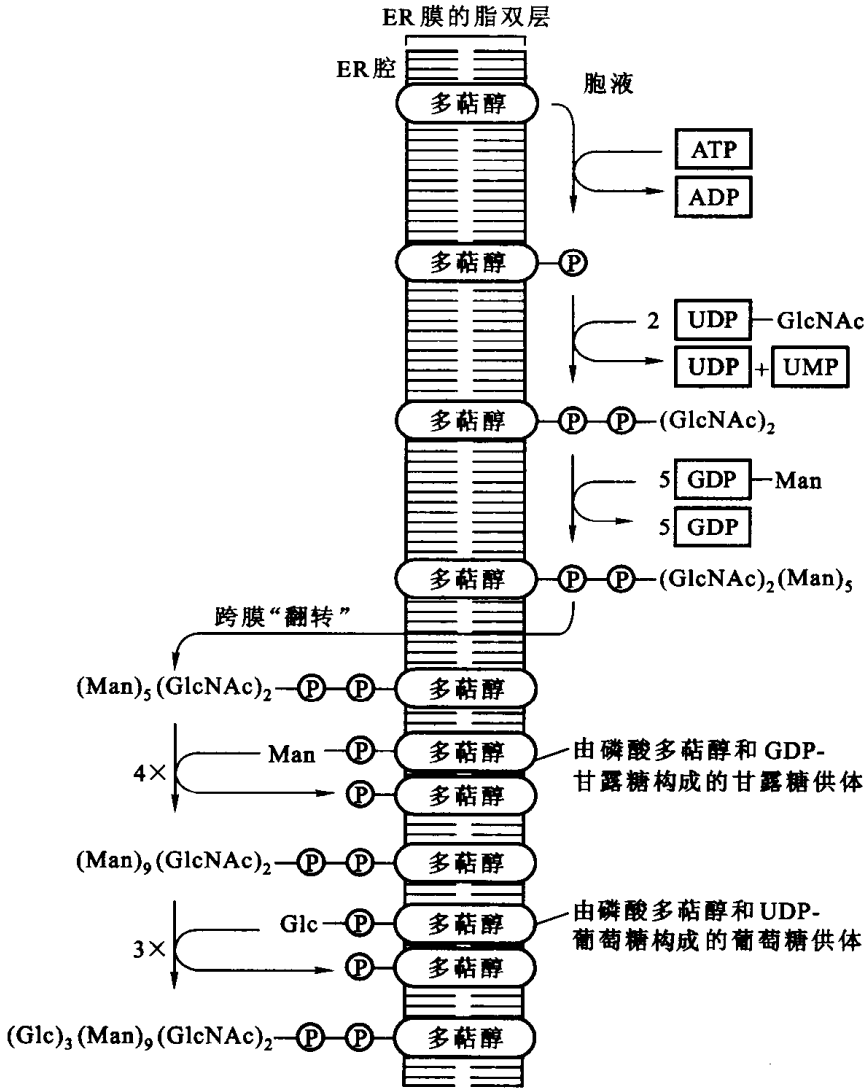


图 4－17 在 rER 膜连接脂类的前体寡糖的合成

寡糖是一个一个糖组装到载体脂类多萜醇上的。多萜醇分子较长且很疏水，由 22 个 5-碳单位构成，能跨过脂双层的厚度 3 倍多。因此连接的寡糖很牢固地锚定在膜上。第一个糖基团通过焦磷酸桥(pyrophosphat bridge)连到多萜醇上，寡糖的合成开始于 ER 膜的胞液面，在 $(Man)_5(GlcNAc)_2$ 脂类中间物形成后，翻转横过脂双层，到腔面继续进行。所有其后的在 ER 腔面的糖基转移反应，涉及从多萜醇－P－葡萄糖和多萜醇－P－甘露糖的转移；这些活化的连接脂类的单糖是从磷酸多萜醇和 UDP－葡萄糖或 GDP－甘露糖在 ER 的胞液面合成的，然后，翻转横过 ER 膜。GlcNAc：*N*－乙酰葡萄糖胺，Man：甘露糖，Glc：葡萄糖(仿 B. Alberts, 等)

N－连接的寡糖结构成熟的糖蛋白具有多样性。这是原来的前体结构经过后来的修饰形成的。当其仍在 ER 中时，3 个葡萄糖残基和 1 个甘露糖残基很快地从大部分糖蛋白的寡糖上去除了。这是寡糖的"整理"(trimming)或"加工"(processing)。当糖基化和转译完成后，糖蛋白经过 ER 腔至高尔基器，在该处寡糖的成分继续被加工和修饰。糖蛋白除了 *N*－连接的寡糖外还有 *O*－连接的寡糖(*O*－linked oligosaccharides)，这些寡糖共价连接到蛋白质的丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸残基侧链上的 OH 基团。*O*－连接的寡糖糖基化作用主要或全部发生在高尔基器内。糖基化作用对糖蛋白的功能和指导大分子到细胞其他部位都很重要。

还有些膜蛋白在进入 ER 腔后，羧基端的跨膜尾部换成共价连接的糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚。这类膜蛋白合成后蛋白前体的疏水的羧基端序列(15～20 个氨基酸)仍锚定在 ER 膜上，其余部分在 ER 腔内(图 4－18)。由 ER 中的酶切去蛋白结合膜的羧基端，并连接新的羧基端到已组装的糖基磷脂酰肌醇中间物的氨基基团上。指定这种修饰的信号包含在疏水的羧基端序列中。如果将这种信号加到其他蛋白上，这些蛋白也以这种方式被修饰。由于共价连接的脂类锚，蛋白仍与膜结合，其所有的氨基酸全在 ER 腔内，最后转移到质膜

外侧。GPI 锚包括 2 个脂肪酸，这些被修饰的蛋白仅以 GPI 锚连到质膜的外侧。大体上，它们能以可溶性状态对质膜上活化特异磷酸酶的信号发生反应，而从细胞中释放出去。例如，锥虫(*Trypanosome*)被寄主的免疫系统侵袭时，就用这种机制脱落它们的 GPI 锚表面蛋白被。

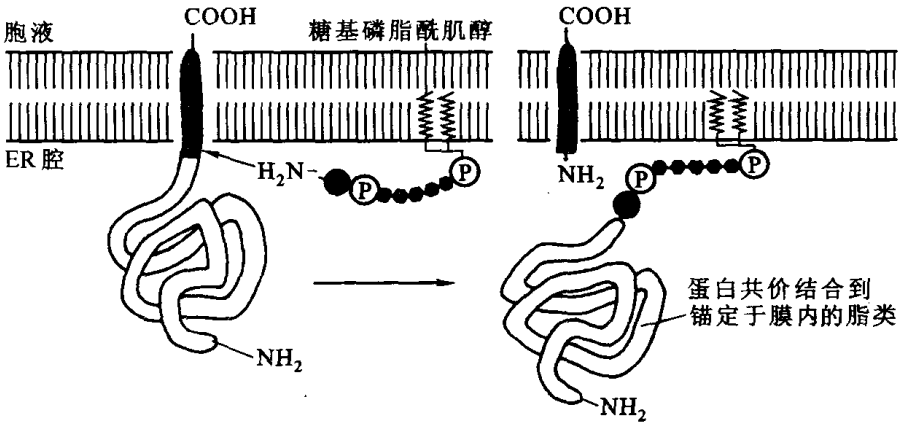


图 4－18 糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚的连接

在蛋白合成后其疏水的 C 端仍锚在 ER 膜内，蛋白其余部分在 ER 腔。由 ER 中的酶切去结合膜的羧基端，同时将新的 C 端连接到糖基磷脂酰肌醇的氨基基团，开始在 ER 腔，最后到质膜的外侧(仿 B. Alberts, 等)

4.3.2.2 脂类的合成

ER 是脂类合成的一个重要场所。已经实验证明，大部分膜的脂双层是在 ER 组装的。ER 膜能合成几乎所有细胞膜需要的脂类，包括磷脂和胆固醇。主要的磷脂是磷脂酰胆碱。磷脂合成所需要的酶均存在于 ER 膜上，在 ER 膜的胞液面有其活性位点，合成磷脂所需要的底物存在于胞液中。因此磷脂的合成只发生在 ER 脂双层胞液面的一半。磷脂酰胆碱的合成过程如图 4－19 所示。其他几种主要的膜磷脂：磷脂酰乙醇胺(PE)和磷脂酰丝氨酸(PS)以及磷脂酰肌醇(PI)等都是以这种方式合成的。

磷脂在 ER 膜上合成后几分钟内就由膜的胞液面转到腔面，其转位速度几乎比自发地转位快 100 000 倍。一般认为这种转移是由对头部基团特异的磷脂转移器(phospholipid translocator)介导的。特别是在 ER 膜看来含有转移器[一种酶(flippase)]，它在 ER 膜的胞液面和腔面之间转移含有胆碱的磷脂，而不转移含有乙醇胺、丝氨醇或肌醇的磷脂。这意味着磷脂酰胆碱比其他磷脂易于达到腔面。转移器负责脂类在脂双层中不对称的分布。

ER 也合成胆固醇和神经酰胺[或称 *N*－酰基鞘氨醇(ceranide)]。后者是由丝氨酸与一脂肪酸缩合形成氨基醇(sphingosine)，然后加上第二个脂肪酸形成神经酰胺。神经酰胺至高尔基器，在该处它作为合成 2 种类型脂类的前体：加上寡糖链形成糖鞘脂类(glycosphingolipid)，由磷脂酰胆碱的磷酸胆碱头部基团转移到其他的神经酰胺分子形成鞘磷脂(sphingomyelin)。糖脂和鞘磷脂存在于脂双层腔面的一半，是由高尔基器腔内的酶催化形成的。

由 ER 膜形成的磷脂运输至质膜、高尔基器膜、溶酶体膜和胞内体膜都是通过运输脂类和蛋白质的运输囊泡进行的；而运输至线粒体和过氧物酶体的则是通过另一种机制，即通过

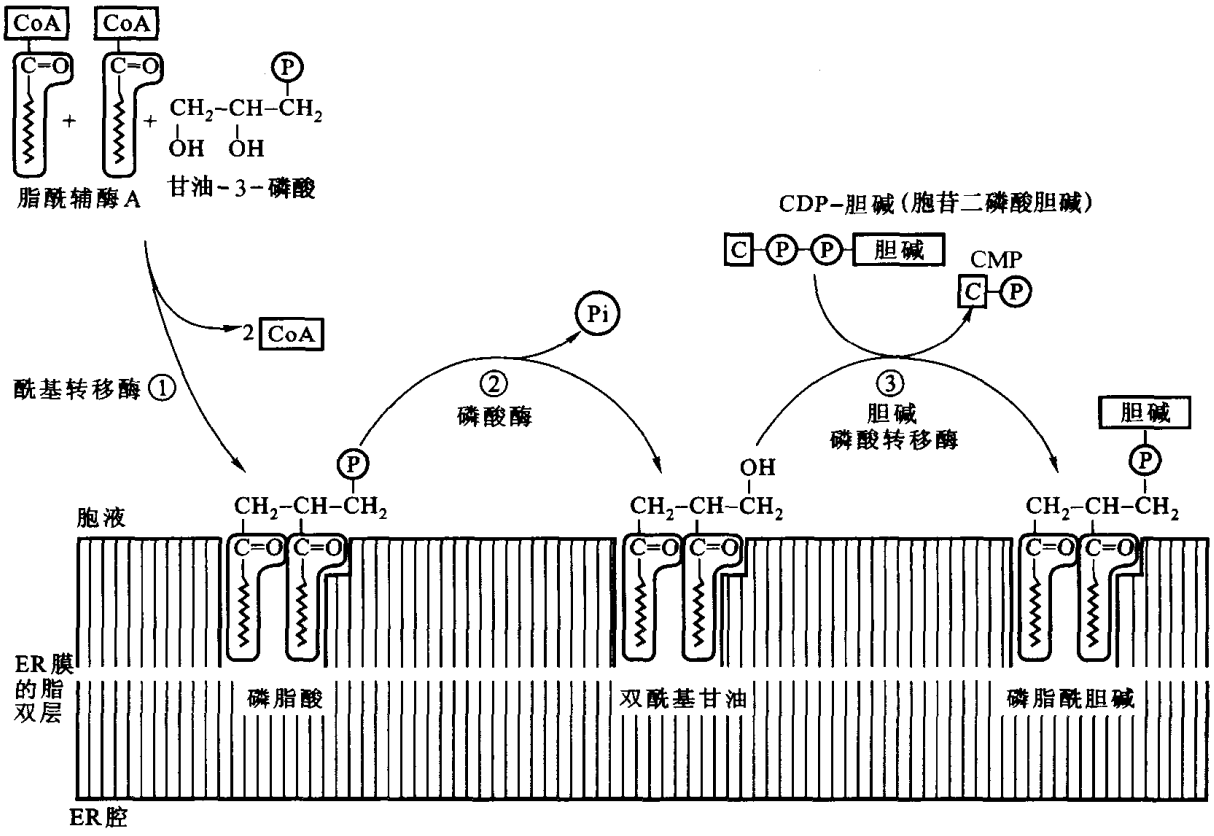


图 4-19 磷脂酰胆碱在 ER 膜上合成的过程

这种磷脂是从脂酰辅酶 A、甘油-3-磷酸和胞苷二磷酸胆碱(CDP-胆碱)合成的。合成的第 1 步由(脂)酰基转移酶(acyl transferase)催化脂酰辅酶 A(fatty acyl CoA)和甘油-3-磷酸,将 2 个脂肪酸加到磷酸甘油形成磷脂酸(phosphatidic acid)。这种化合物不溶于水,合成后便保留在脂双层中。其后第 2、3 步分别由磷酸酶和胆碱磷酸转移酶(choline phosphotransferase)催化,最后形成脂类分子的头部基团

一种溶于水的载体蛋白称为磷脂调换蛋白(phospholipid exchange protein)或称磷脂转移蛋白(phospholipid transfer protein),将磷脂从 ER 运输到线粒体、叶绿体和过氧物酶体。经体外实验已表明,这种调换蛋白分子在膜之间能转移单个磷脂分子。每一种磷脂调换蛋白仅能识别一种磷脂。它能从 ER 膜磷脂中"提取"单个分子,并将磷脂及其结合位点埋藏在其分子内,成为水溶性的复合物进入胞液中,通过自由扩散,碰到其他的膜,调换蛋白放出结合的磷脂分子到另一个脂双层(图 4-20)。已报道磷脂酰丝氨酸是以这种方式运输至线粒体,然后脱羧形成磷脂酰乙醇胺;而磷脂酰胆碱则是原封不动地输入到线粒体。磷脂调换蛋白在所有膜之间随机地分配磷脂。原则上这种随机的调换转移过程,会导致从磷脂多的膜到磷脂少的膜的脂

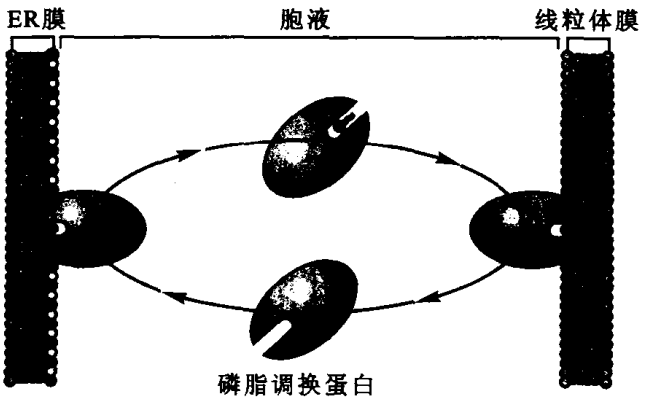


图 4-20 磷脂调换蛋白转移磷脂示意图
(仿 G. Karp, 1999)

类运输。例如,磷脂酰胆碱和磷脂酰丝氨酸从 ER 被转移到线粒体和过氧物酶体膜。可能线粒体和过氧物酶体膜是脂类少的。当然,可能也存在其他转移磷脂的机制。

sER 还能合成某些类型的脂类,如类固醇的合成广泛存在于分泌类固醇激素的细胞,如生殖腺、肾上腺皮质细胞中 sER 相当发达,其中含有合成类固醇激素的一些关键的酶。还有,在肝细胞 ER 中能合成脂蛋白,包括一类极低密度脂蛋白(very - low - density lipoprotein, VLDL 或 LDL)。一般认为它是由 rER 合成的蛋白和 sER 合成的脂类复合而成,呈脂蛋白小滴经高尔基器和囊泡分泌出去,对运输胆固醇和血液中的其他脂类很重要,如携带甘油三酯到储存脂肪的脂肪组织。

4.3.2.3 糖类代谢

已有实验证明,ER 参与糖原分解。研究新出生动物,观察到在肝细胞分化时,葡萄糖 - 6 - 磷酸酶首先出现在 rER 上,然后出现在 sER 部分。葡糖 - 6 - 磷酸酶在 sER 的膜内,在肝细胞它能把来自胞液的葡萄糖 - 6 - 磷酸(糖原在胞液中降解的产物)分解为磷酸与葡萄糖,然后葡萄糖可能经过 ER 腔,最后被释放到血液中。一般认为,葡萄糖 - 6 - 磷酸酶可去除连接葡萄糖的磷酸,存在于肝细胞和其他类型细胞的 ER 内。非磷酸化的葡萄糖,比磷酸化的更易通过质膜,离开细胞。可见,这种酶参与糖原代谢是将磷酸化的葡萄糖转变成非磷酸化的形式。

关于糖原合成与 sER 关系的问题,在肝细胞曾发现糖原的分布与 sER 密切结合。如把动物绝食 5 d,可见 sER 的小管小囊集中围绕残余的糖原,再喂食,sER 的量显著增加。似可说明 sER 与糖原合成有关,但是另有实验结果与此相反。如尿苷二磷酸葡萄糖 - 糖原转移酶(UDPG - glycogen transferase)通过把 UDPG 加到引物糖原(primer glycogen)上而参与糖原合成。这种酶是结合到糖原颗粒而不是结合到膜上,由此表明 ER 与糖原合成无关。

4.3.2.4 解毒作用

与解毒作用有关的酶系主要大量存在于肝细胞的 sER,重要的酶系是电子传递体系:细胞色素 P_{450}、NADPH - 细胞色素 P_{450}还原酶、细胞色素 b_5、NADH - 细胞色素 b_5 还原酶、NADPH - 细胞色素 c 还原酶等。除了细胞色素 P_{450}为跨膜蛋白外,其他都是不对称地嵌入 ER 膜内,露出于膜的细胞质面或 ER 腔面。这些酶在 ER 膜内的位置与其催化功能有关,如细胞色素 b_5 与 NADH - 细胞色素 b_5 还原酶(图 4 - 21)。NADPH - 细胞色素 P_{450}还原酶,辅基是黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD),催化 NADPH 和细胞色素 P_{450}之间的电子传递。

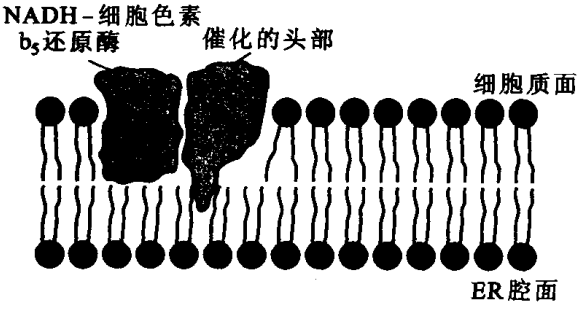


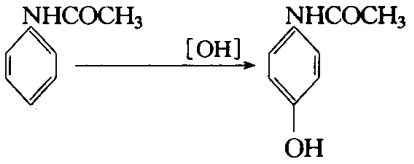
图 4 - 21 细胞色素 b_5 及 NADH - 细胞色素 b_5 还原酶在 ER 膜内分布示意图

细胞色素 b_5 相对分子质量为 1.1×10^4,位于 ER 的细胞质面,该酶有一亲水的具催化活性的头部和一疏水的无催化活性的尾部,伸入脂双层中起固定作用。NADH - 细胞色素 b_5 还原酶供应电子给细胞色素 b_5,其在 ER 膜内的位置与细胞色素 b_5 相似。这两种酶的位置有利于进行催化功能时相互作用(仿 Neal O. Thorpe)

ER 的电子传递链在功能细节上与线粒体和叶绿体的不同。ER 的电子传递链较短,在电子传递、氧化还原过程中,能催化多种化合物羟基化(hydroxylation)或其他加氧反应(表 4

-2),能使多种脂溶性的物质如许多药物、毒物、类固醇等氧化,它所催化的反应,确切地说,都是在作用物分子中加入 1 个氧原子,因此 ER 的电子传递酶系也称为加单氧酶(monooxygenases)系,或称为羟化酶,或称为混合功能氧化酶(mixed function oxidases)。后一名称是由于氧分子起了"混合"功能的作用:1 个氧原子还原为水,另 1 个氧原子进入作用物的分子中。这些酶的催化反应与体内很多重要的活性物质的合成、灭活以及药物、毒物包括致变致癌物的生物转化等过程都有密切关系。其中对药物、毒物的转化作用,主要是药物、毒物经氧化、羟化后,消除了其作用或毒性;且因为羟化 ,出现羟基,极性增强,易于排泄。但也有的药物或毒物经氧化作用后反而增强了毒性。如 3,4 - 苯并芘及黄曲霉素等致癌物在体内径 sER 的氧化作用生成环氧化物,可与核酸等大分子作用而导致癌变。

表 4 - 2 细胞色素 P450 催化的一些羟基化反应

芳香族的羟化作用	
脂肪族的羟化作用	$R-CH_3 \xrightarrow{[OH]} R-CH_2-OH+H^+$
N - 脱烷基作用	$R-NH-CH_3 \xrightarrow{[OH]} [R-NH-CH_2OH] \longrightarrow RNH_2+CH_2O$(甲醛)
O - 脱烷基作用	$R-O-CH_3 \xrightarrow{[OH]} [R-O-CH_2OH] \longrightarrow ROH+CH_2O$
脱氨基作用	$R-CH(NH_2)-CH_3 \xrightarrow{[OH]} [R-C(OH)(NH_2)-CH_3] \longrightarrow R-CO-CH_2+NH_3$
硫氧化作用	$R-S-R \xrightarrow{[OH]} [R-SOH-R']^+ \longrightarrow R-SO-R'+H^+$
N - 氧化作用	$(CH_3)_3N \xrightarrow{[OH]} [(CH_3)_3NOH]^+ \longrightarrow (CH_3)_3NO+H^+$

(自 N.O. Thorpe)

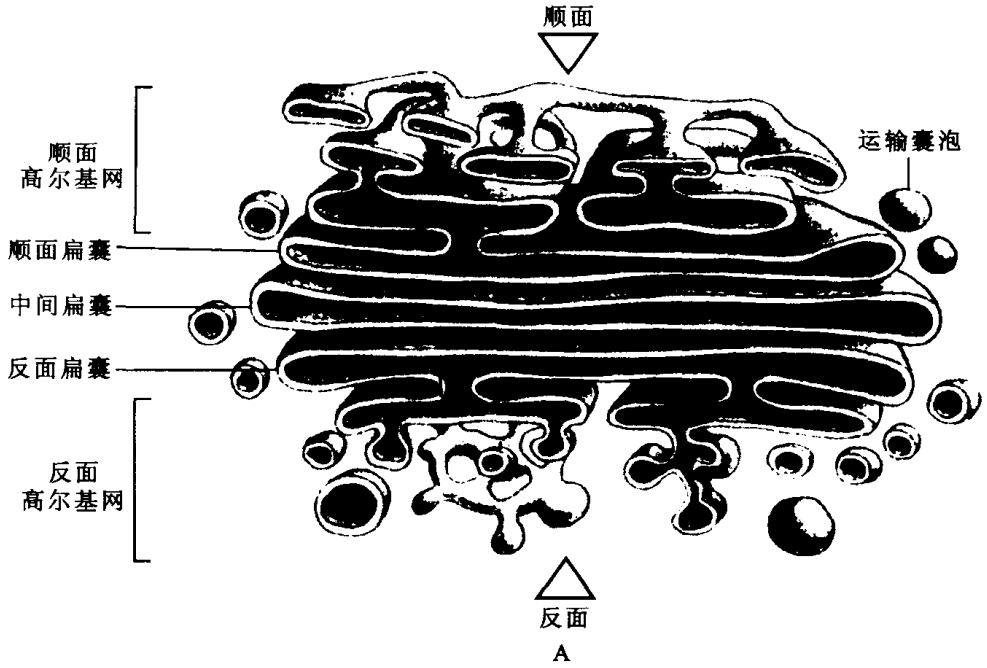
4.4 高尔基器

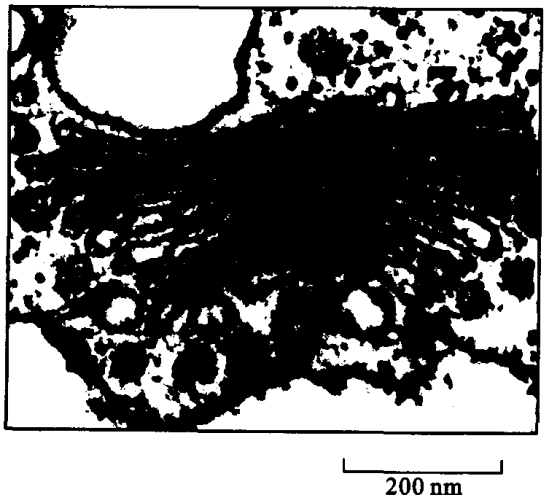
高尔基器(Golgi apparatus)或称高尔基复合体(Golgi complex)、高尔基体(Golgi body)、内网器(internal reticular apparatus)。它是由意大利的学者 Camillo Golgi(1898)首先发现的。他用银染方法在一种枭和猫的神经细胞中发现有嗜银的网状结构,称为内网器。此后在各种动物细胞中均看到有类似结构,但在无脊椎动物细胞中一般不呈网状,而是一些分散的呈圆形或凹盘形结构,称为分散高尔基器(dictyosome)。这些结构均有还原银(或锇)的能力(用硝酸银或锇酸处理可显示出来),因此认为分散高尔基器与网状结构是同源结构。由于过去研究主要用固定染色技术,用硝酸银或锇酸处理后所看到的高尔基器形态变化较大,而且由于高尔基器的折光率与基质相似,在活细胞中一般看不见,因此对高尔基器是否真实存在曾引起一些人的怀疑,多年来一直争论不休,直到 20 世纪 50 年代应用电子显微镜研究附睾、胰腺细胞、神经细胞和肾细胞等的高尔基器才澄清了这个问题,了解了高尔基器的微细结构。也发现在植物细胞中有分散高尔基器。对高尔基器功能的研究,现代生物技术的

进展起了极大的推动作用。高尔基器也是内膜系统中的重要房室，新合成的蛋白质在 ER 中进入生物合成分泌途径，从 ER 运输至高尔基器，再从高尔基器分泌出细胞或运输至细胞其他部位。高尔基器是来自 ER 产物的加工分选和发送站，也是糖类合成的主要场所。

4.4.1　高尔基器的形态结构

在光镜下，脊椎动物大多数细胞的高尔基器呈复杂的网状结构。在具有生理极性的细胞（如胰腺细胞、甲状腺细胞、肠上皮粘液细胞等），高尔基器多分布在细胞核的附近，趋于细胞的一个极。也有的围绕着核分布，如神经细胞、卵细胞、精细胞以及大多数无脊椎动物细





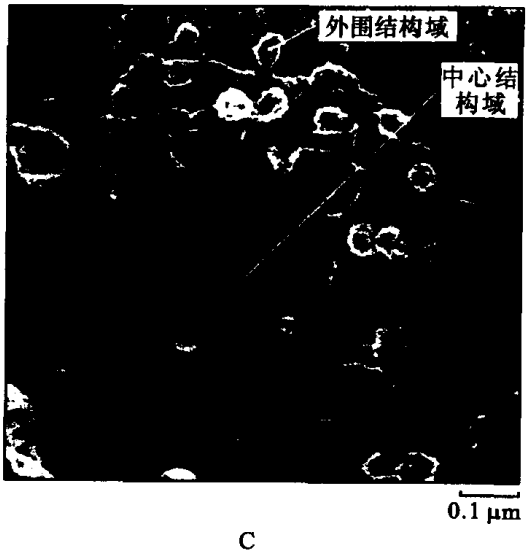


图 4－22　高尔基器

A. 一个高尔基堆的三维结构（根据动物分泌细胞高尔基器电镜照片重建）；B. 植物细胞的一个高尔基堆的电镜照片；C. 单个高尔基扁囊的电镜照片，示 2 个清楚的结构域：凹陷的中心结构域和不规则的外围结构域（A 引自 A. Rambourg, 等；B 引自 G. Palade；C 引自 P. J. Weidman, 等）

胞和植物细胞，具分散高尔基器。据估计，每个肝细胞约有 50 个高尔基器，植物细胞有几十个到几百个分散在整个细胞质中。高尔基器的形状、大小、分布在不同类型细胞不同，也随着细胞的生理状态而改变，但在已成熟的细胞它们却显示有共同的形态特征。

在电镜下，可见高尔基器是由光滑膜组成的，其显著特征是由一些排列有序的扁平囊[或称小池(cisternae)]形成的，类似于扁盘堆叠的结构，称为高尔基堆(或叠层，Golgi stack)，在扁囊周围常结合有一些小管小囊相连成网和大小不同的有被或无被的囊泡(图 4-22)。扁囊内充满无定形或颗粒的内容物。一般高尔基器中的扁囊常为 3～8 个，某些藻类可达一二十个。一般高等动物的高尔基器由一堆或几堆扁囊形成，分散高尔基器的每一个就是一个高尔基堆。

高尔基器显示有极性，在靠近细胞中心的一面常为凸的，称为顺面(*cis* face)，或称形成面(forming face)，在远细胞中心的另一面常为凹的，称为反面(*trans* face)或称成熟面(maturing face)。这两个面的形态、化学组成、功能以及与其他膜成分的结合是不同的，按一般电镜观察显示不出高尔基堆内各个扁囊之间的差异。近些年有研究者(James E. Rothman，等，1985)应用单克隆抗体免疫细胞化学电镜技术，已证明高尔基器堆至少可分为 3 个区隔[或称房室(compartment)]，每个区隔内含有的酶不同，功能不同(图 4-23)。现在一般将高尔基器按其功能不同从顺面到反面分为：顺面高尔基网(*cis* Golgi network，CGN)一系列的扁囊依次分为顺面、中间及反面扁囊或称区隔(*cis*，media & *trans* cisternae)，反面高尔基网(*trans* Golgi network，TGN)(图 4-22)。由于各部分含有的酶不同，因此功能不一，依次对来自 ER 的蛋白进行加工和修饰，然后经 TGN 分选，离开高尔基器。

图 4-23 高尔基器扁囊中已鉴定出 3 个区隔，各含一组特有的酶

电镜照片表明高尔基器由 4 个扁囊形成，中间 1 对扁囊已被染成黑色，说明具有 *N*-乙酰葡萄糖胺加到糖蛋白的一种酶。这种染色方法是首先制备出该种酶的单克隆抗体，抗体同辣根过氧化物酶偶联，后者的产物能染成黑色。当抗体注入兔肝细胞时，抗体与扁囊中 *N*-乙酰葡萄糖胺转移酶结合，且因过氧化物酶而被染色，即中间区隔内含有 *N*-乙酰葡萄糖胺转移酶。已证明半乳糖转移酶只存在于反面的扁囊，推断磷酸转移酶是在顺面第一个区隔内(引自 James E. Rothman，等)

4.4.2 高尔基器的功能

高尔基器参加细胞的分泌过程,而且对分泌的糖蛋白和其他的糖蛋白具有修饰加工分类包装以供转运的作用,实际高尔基器是糖类生物合成的主要场所,如完成糖蛋白的合成、多糖的合成,以及氨基多糖的硫酸化,都在高尔基器内进行。

高尔基器是 ER 产物的分选和发送站,它所合成的糖类,很大比例作为寡糖侧链连接到从 ER 来的蛋白质和脂类上,某些寡糖基团经磷酸化作为标记指导特异蛋白质到溶酶体或其他部位。

4.4.2.1 糖蛋白的合成、加工与分泌

已知真核细胞的糖蛋白根据其成分结构的不同分为两大类:具有 *N* - 连接的寡糖链,具 *O* - 连接的寡糖。*N* - 连接的寡糖糖蛋白的合成开始是在 ER 腔内,完成糖蛋白的合成是在高尔基器内。在 ER 腔中,由 *N* - 乙酰葡萄糖胺、甘露糖、葡萄糖形成的寡糖共价地结合到蛋白质天冬酰胺残基侧链的氨基基团的 N 原子上,形成 *N* - 连接的寡糖糖蛋白。新形成的糖蛋白有相同的寡糖分子(见图 4 - 15、16)。寡糖有 14 个糖分子,其中有 2 个 *N* - 乙酰葡萄糖胺、9 个甘露糖以及 3 个葡萄糖分子。但是不知何种原因,在 ER 腔中这 3 个葡萄糖分子和 1 个甘露糖分子很快地被除去,然后由 ER 经过小囊泡转运到高尔基器顺面与之结合。到达高尔基器的糖蛋白一般具有相同的寡糖,其中分泌性蛋白和膜蛋白经过明显的加工,由甘露糖苷酶的作用去除大部分甘露糖。由不同的糖基转移酶相继加上其他的糖,完成了糖蛋白的合成(图 4 - 24)。这一反应过程已经酶活性的测定、生化分析得到了证实。同时,与许多应用整个细胞进行同位素标记、放射自显影电镜的研究,所得结果是一致的。例如,将细胞用 ^3H 标记的甘露糖进行短期培养,经放射自显影后,只在 ER 里出现银颗粒;用 ^3H - 半乳糖和 ^3H - 唾液酸在电镜放射自显影仅存在于高尔基器;用 ^3H - *N* - 乙酰葡萄糖胺,结果在 ER 和高尔基器同时被标记。这说明甘露糖、*N* - 乙酰葡萄糖胺存在于糖蛋白寡糖链的核心,在 ER 腔内;而半乳糖、唾液酸存在于寡糖链的端部区域,在高尔基器内。

近些年来 James E. Rothman 根据自己、合作者和其他人的研究,提出了高尔基器叠层具有生化区隔化[或房室化(compartmentation)]的新看法。他通过密度梯度离心分出 3 个不同密度的高尔基器碎片。化学分析表明,每种密度的碎片与一组加工酶相联系:密度最大的碎片含有磷酸转移酶,它能催化磷酸基团加到溶酶体蛋白上;中等密度的碎片含有甘露糖苷酶Ⅰ、Ⅱ和 *N* - 乙酰葡萄糖胺转移酶;密度最低的碎片含有半乳糖基转移酶及唾液酸基转移酶。这一结果表明至少有 3 种高尔基器扁囊。Rothman 等又进一步精心设计,应用转移酶的单克隆抗体免疫细胞化学电镜技术,发现 *N* - 乙酰葡萄糖胺转移酶Ⅰ只在高尔基器叠层中央的两三个扁囊里,这些扁囊称为中间扁囊,另有相似的实验证明半乳糖基转移酶、唾液酸基转移酶只存在于反面的扁囊(图 4 - 23、4 - 25)。由此可见,糖蛋白在移动到反面扁囊之前,在中间扁囊接受 *N* - 乙酰葡萄糖胺,在反面扁囊糖蛋白接受半乳糖、唾液酸等。磷酸转移酶存在于顺面扁囊。因此指出高尔基器扁囊堆至少可分 3 个区隔(图 4 - 25),各由 1 个或多个扁囊组成,每个区隔中含有完成蛋白质修饰过程中一些特定的酶。所有与糖基化有关的酶均为整合膜蛋白,其活性部位位于高尔基区隔的腔面。区隔类似于工厂的工段,要正确修饰加工某种蛋白,必须依次通过所有的工段。溶酶体酶蛋白在加工过程中,保留了全部甘露糖,在高尔基器顺面区隔中存在 *N* - 乙酰葡萄糖胺磷酸转移酶和磷酸葡萄糖苷酶。

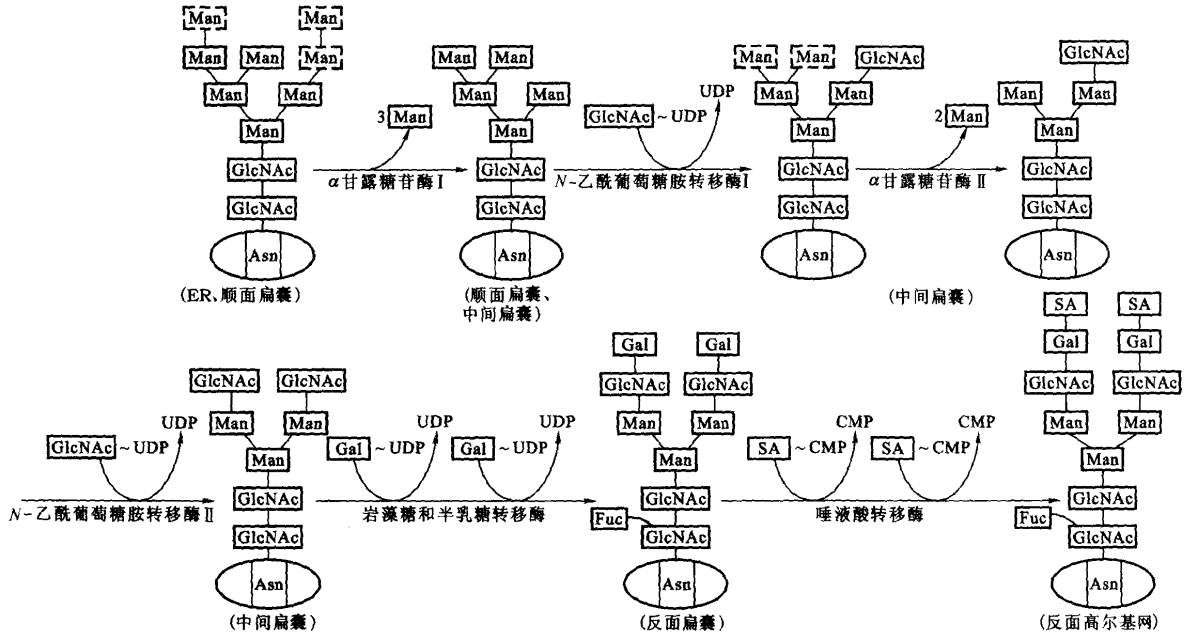


图 4-24　在高尔基器内由一系列的酶促反应完成糖蛋白的合成

甘露糖的去除分二步进行:先由甘露糖苷酶Ⅰ除去3个甘露糖,紧接着 *N*-乙酰葡萄糖胺转移酶Ⅰ,将1分子 *N*-乙酰葡萄糖胺结合到1个存留的甘露糖上,然后甘露糖苷酶Ⅱ去除另外两个甘露糖,这就形成了存在于复合寡糖上的3个甘露糖核心。在此阶段核心中2个 *N*-乙酰葡萄糖胺之间的键通过一种高特异性的内糖苷酶(endoglycosidase)成为稳定的连接。典型的包含2个 *N*-乙酰葡萄糖胺和3个甘露糖与数目可变的 *N*-乙酰葡萄糖胺、半乳糖、唾液酸和岩藻糖结合在一起。即在核心甘露糖上由 *N*-乙酰葡萄糖胺转移酶Ⅱ再加上另一个 *N*-乙酰葡萄糖胺分子。此后,再经过半乳糖基转移酶、唾液酸基转移酶等的作用,再加上半乳糖和唾液酸等,完成了糖蛋白的合成。在高尔基器中反应底物——核苷酸单糖(nucleotide sugar)从胞液面通过载体蛋白转运到区隔的腔面(图内未表示)(引自 J. E. Rothman,参考 G. Karp,1999,略修改)

Man甘露糖　Glc葡萄糖　GlcNAc *N*-乙酰葡萄糖胺　Asn天冬酰胺　SA唾液酸　Gal半乳糖　Fuc岩藻糖

经此两种酶的催化，寡糖链中的甘露糖残基磷酸化形成 6 - 磷酸甘露糖（mannose-6-phosphate, M6P）。由于在顺面区隔溶酶体蛋白接受了磷酸基团，保护了甘露糖免受中间区隔甘露糖苷酶的切割，所以在中间区隔和反面区隔里 *N* - 乙酰葡萄糖胺、半乳糖、唾液酸等不能掺入。区隔化对分类运送蛋白也可能有作用。

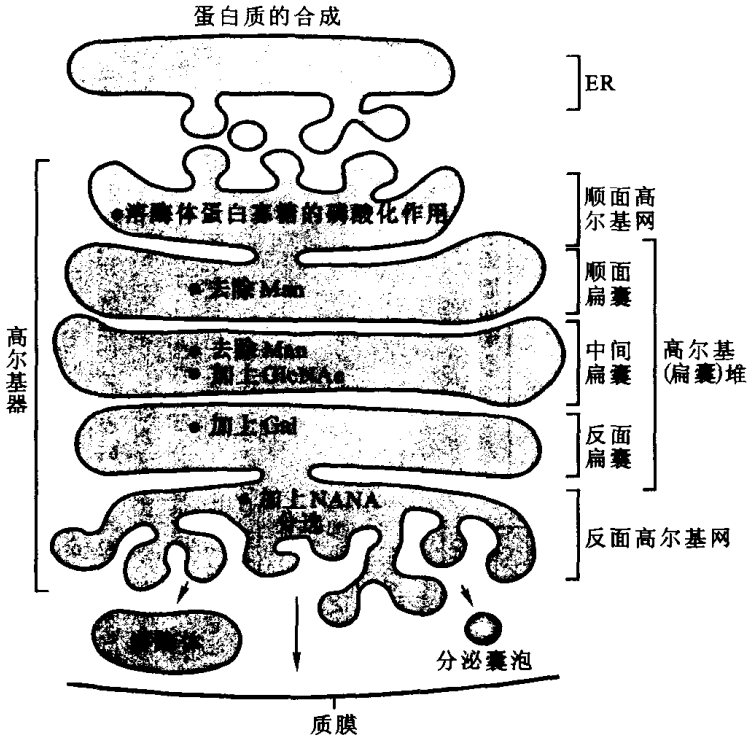


图 4 - 25 高尔基器的功能区隔化示意图

迄今已证明有 3 个功能上分开的区隔，每个区隔有时有 2 个或更多的扁囊为一组，其中可能有更精细的再分（有待发现）或者仅有 3 个区隔，其余的代表 3 个功能单位的多拷贝。现在尚不清楚每种加工的酶是否完全局限在特定的扁囊或者是否它横过高尔基堆呈梯度分布。这样早期作用的酶大部分存在于顺面高尔基扁囊，后期作用的酶大部分在反面的扁囊（仿 B. Alberts, 等）

O - 连接的寡糖主要或全部在高尔基器反面扁囊和反面高尔基网内合成。它与 *N* - 连接的寡糖不同，是由不同的糖基转移酶依次催化，加上一个个单糖，最后加上唾液酸残基，完成糖蛋白的合成。

其他的示踪实验已证明高尔基器是分泌的多糖类合成的场所。如植物细胞分泌的细胞壁的多糖类成分——纤维素果胶是高尔基器合成的分泌产物。动物细胞如软骨细胞分泌的粘多糖和糖蛋白也是在高尔基器中合成的，其中硫酸软骨素的硫酸基团是在高尔基器的扁囊内加到糖蛋白的糖链部分的。

4.4.2.2 从 ER 经过高尔基器的运输

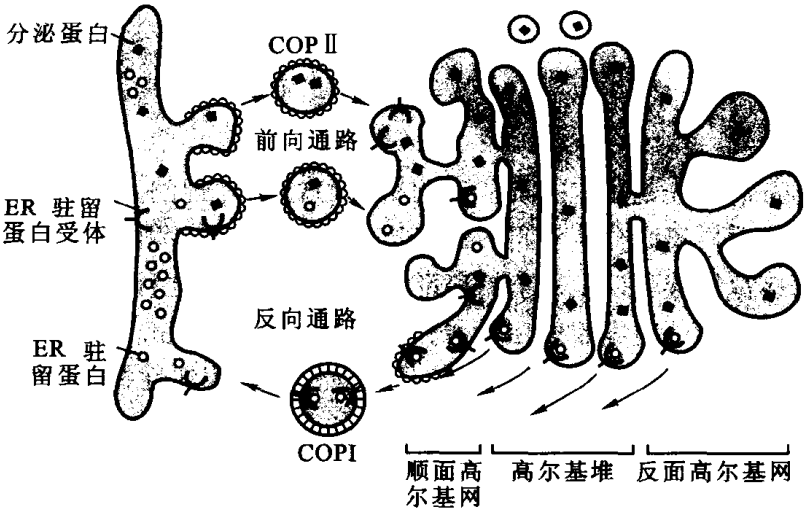
蛋白质的合成从胞液中的核蛋白体上开始，运输到 ER，横过 ER 膜，新合成的蛋白在 ER 中进入生物合成分泌途径；其后的运输，从 ER 运输至高尔基器，并从高尔基器到细胞表面或其他部位，都是通过运输囊泡进行的。通过囊泡出芽和融合的循环，它运输蛋白从膜到膜、从腔到腔（或到细胞外空间）。

从 ER 到高尔基器的小囊，是从 ER 称为转移成分的特化区域出芽形成的（图 4 - 9）。这个区域的膜没有结合的核蛋白体，常位于 rER 和高尔基器之间。过去一般认为从 ER 转移成分出芽，形成的小囊泡无选择性，它们将 ER 中的蛋白运输到高尔基器。现已有实验证明，从 ER 出芽形成具有 COP Ⅱ 蛋白被的囊泡能运输物质从 ER 到顺面高尔基网（图 4 - 26A）。COP Ⅱ 被小囊（COP Ⅱ coated vesicle）对其运输物有选择和浓缩作用（图 4 - 26B）。

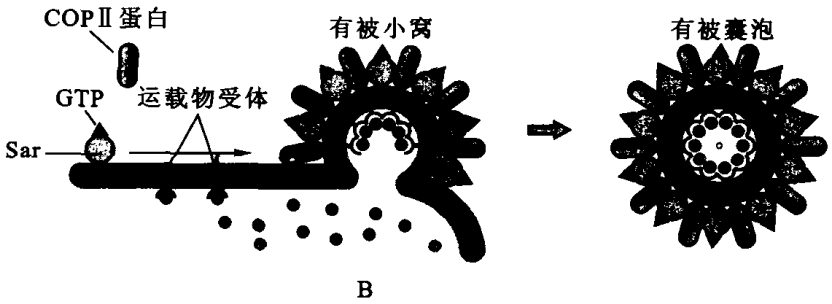
COPⅡ被含有5种蛋白亚单位，在COPⅡ被蛋白之间有一小的称为Sar的GTP结合蛋白，像其他的GTP结合蛋白一样，Sar调节囊泡被的组装和去组装(图4-26B)。

从ER出口的蛋白质必须是正确折叠和组装的。那些错误折叠或未完全组装成其蛋白复合物的还保留在ER，或者结合到特异结合蛋白Bip，或者那些不能包装的聚集物，最后在ER内降解。这样，ER的出口可被看作是质量的检查点。除非那些折叠和组装的亚单位是完全成功的蛋白，否则就报废了。看来ER是细胞中蛋白质降解的主要场所之一(还有溶酶体和胞液)。

正确折叠的蛋白质被运输出ER不需要特异的信号。但是那些像Bip在ER腔驻留的蛋白质确需要驻留在该处的信号[保留ER驻留蛋白是4个氨基酸(Lys-Asp-Glu-Leu-COO^-)的分选信号，见表4-1]。保留信号不仅能使驻留蛋白保留在ER腔中，也能将那些已排出到运输小囊，并被送到顺面高尔基网的ER-驻留蛋白选择性地回收。在顺面高尔基



A



B

图4-26 COPⅡ被和COPⅠ被小囊介导ER和高尔基器间的运输

A. COPⅡ被囊泡介导从ER到高尔基器的运输以及COPⅠ被囊泡介导从高尔基器返回ER的运输——保留ER驻留蛋白的机制。在顺面高尔基网的膜受体捕捉这些逸出蛋白，经囊泡运输返回ER。在ER的离子条件下，驻留蛋白与受体分离，然后受体又返回到顺面高尔基网再利用。ER保留信号的受体也存在于中间和反面的高尔基扁囊中；B. COPⅡ被囊泡的组装，Sar-GTP结合到ER膜启动了COPⅡ蛋白组装形成囊泡被，包被蛋白结合到ER跨膜蛋白受体在胞液面的尾部信号肽，ER内被运输的物质结合到跨膜蛋白受体的腔面端，通过其胞液尾部信号与COPⅡ被之间的相互作用，受体及其结合的蛋白集中浓缩成为出芽囊泡，COPⅡ被去组装是由结合的GTP水解触发的，形成Sar-GDP(无活性)从囊泡脱落下来，随着COPⅡ蛋白释放到胞液中再利用(A仿B. Alberts, 等；B仿G. Karp)

网有一种特异地结合膜的受体蛋白结合到 ER 保留信号，并将那些显示这种信号的任何蛋白包裹起来，成为特异的运输囊泡，这些囊泡具有 COP Ⅰ 蛋白被，COP Ⅰ 被小囊(COP Ⅰ coated vesicle)介导从高尔基网返回 ER 的运输(图 4－26)。对这些驻留蛋白，ER 像一个开放的监狱，没有什么阻止它们离开，可是如果它们离开了，就被捉回。且 ER 保留信号的受体也发现在高尔基器的其他区隔里，这表明，从这些区隔到 ER 也存在有返回途径。

COP Ⅰ 被也含有 GTP 结合蛋白，这种结合 GTP 的蛋白称为 Arf，是构成 COP Ⅰ 被 8 种蛋白之一，Arf 也对 COP Ⅰ 被的组装与去组装起作用。COP Ⅰ 被小囊除介导从高尔基器返回 ER 的运输外，有人认为它也参与从 ER 到高尔基器和/或通过高尔基器从顺面到反面的运输。

从 ER 合成的蛋白运输至高尔基器，在高尔基器内经加工修饰后，从反面高尔基网出芽，由包涵素被小囊运输到胞内体、溶酶体、植物液泡、质膜或排出细胞(图 4－25)，或从质膜沿内吞途径到细胞的不同房室(详见第 3 章)。

4.5 溶酶体

溶酶体(lysosome)首先是由 Christian de Duve (1955)发现的。他在离心分析鼠肝细胞匀浆时，去除线粒体后再离心分离获得一层具高浓度的酸性磷酸酶、组织蛋白酶、酸性核糖核酸酶、酸性脱氧核糖核酸酶以及 β 葡糖醛酸苷酶等的颗粒，他称其为溶酶体，说明其中有丰富的水解酶，并推断其外包围着一层脂蛋白膜。Navikoff Beaufay 及 Holt 用细胞化学电镜法，观察细胞中沉淀的酶的反应产物，证实了具有酸性磷酸酶活性的颗粒表面确实包着一层膜。此后发现这种细胞器存在于所有原生动物和多细胞动物(仅少数细胞例外，如哺乳动物红细胞)。在植物细胞中也发现有类似溶酶体的细胞器。溶酶体是细胞内消化的主要场所。

4.5.1 溶酶体的形态结构

溶酶体的形态大小差异较大，其直径一般在 0.2～0.8 μm，最小的为 0.05 μm，最大者可达几微米。由于其中含有高浓度的酸性磷酸酶，因此用 Gomori 的酸性磷酸酶法显示，在光镜下成为可见的小颗粒。用电镜细胞化学方法观察，可见溶酶体由一个单位膜包围着，一般为球形(图 4－27)。在溶酶体内含有多种水解酶，现已肯定的，除了 C. de Duve 等原来所发现的酸性磷酸酶、组织蛋白酶、酸性脱氧核糖核酸酶、酸性核糖核酸酶和 β 葡糖醛酸苷酶以外，还有芳基硫酸酯酶 A 和 B(arylsulfatases A and B)、组织蛋白酶 A 和 B(cathepsins A 和 B)及组织蛋白酶 C、磷蛋白磷酸酶(phospho-protein phosphatase)、β 半乳糖苷酶(β－galactosidase)、β－*N*－乙酰氨基葡糖苷酶(β－*N*-acetyl-glucosaminidase)和 α 甘露糖苷酶(α－mannosidase)等。到目前已发现约有 60 余种酸性水解酶，这些酶的最适 pH 为 5.0。概括起来包括：蛋白酶、核酸酶、糖苷酶、脂酶、磷酸(酯)酶、硫酸酯酶和磷脂酶等(图 4－28)。这些酶在酸性溶液内都能分解重要的生物化合物——蛋白质、核酸、多糖及脂类等，但在正常细胞内这些重要的活性物质并不被这些酶所消化，而且溶酶体自身的膜也不被消化，又能保持溶酶体内的酸性环境，这与溶酶体膜的结构和功能特征密切相关。在溶酶体膜上具有质子泵(proton pump)，依赖 ATP 水解放出能量将 H^+ 泵入溶酶体内以维持其内腔的酸性 pH(图 4－28)。构成溶酶体膜的蛋白质是异乎寻常地高度糖基化。一般认为这可保护膜免受

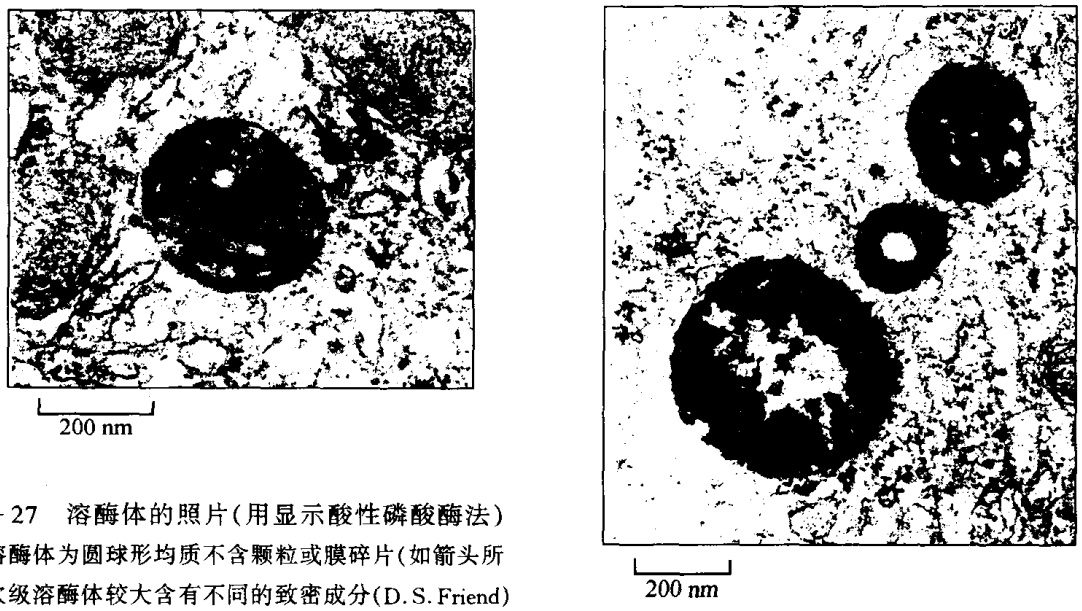


图 4－27 溶酶体的照片(用显示酸性磷酸酶法)初级溶酶体为圆球形均质不含颗粒或膜碎片(如箭头所示),次级溶酶体较大含有不同的致密成分(D. S. Friend)

溶酶体内蛋白酶的消化。在溶酶体外细胞质内的环境一般为 pH 7.0～7.3,在此环境中溶酶体酶的活性大为降低,因此即使有少量的溶酶体酶漏出到细胞质中,胞质成分也不致于被降解。

溶酶体的酶蛋白是在 rER 的核蛋白体上合成的,一般认为溶酶体形成的主要位置是在高尔基器。溶酶体在发育和生理功能的不同阶段,形态、名称也不一样。从反面高尔基器扁囊端部膨大或反面高尔基网脱离下来所形成的溶酶体称为初级溶酶体(primary lysosome)或原溶酶体或前溶酶体(proto-lysosome 或 prelysosome),也曾称为致密体(dense body)或无活性的溶酶体(inactive lysosome)。其中的酶没有活性,呈圆球形,不含有明显的颗粒。当初级溶酶体与来自细胞外部或内部的物质相互作用时,就称为次级溶酶体(secondary lysosome)。次级溶酶体形状常不规则,较大,且含有正在消化的颗粒或膜的碎片等。由于初级溶酶体与所作用物的来源不同,次级溶酶体又有不同的名称,如果初级溶酶体与吞噬泡融合,所形成的次级溶酶体又称为吞噬溶酶体(phago－lysosome);如果初级溶酶体与呈小亮泡形态的胞饮泡相遇,它们可被并入到初级溶酶体内,这时从外观上看这些完整的小泡出现在溶酶体内,这种次级溶酶体又称为多泡小体(multivesicular body)。次级溶酶体又称为消化泡,如以上所述,被消化的物质是外源的,也可称为异体吞噬泡

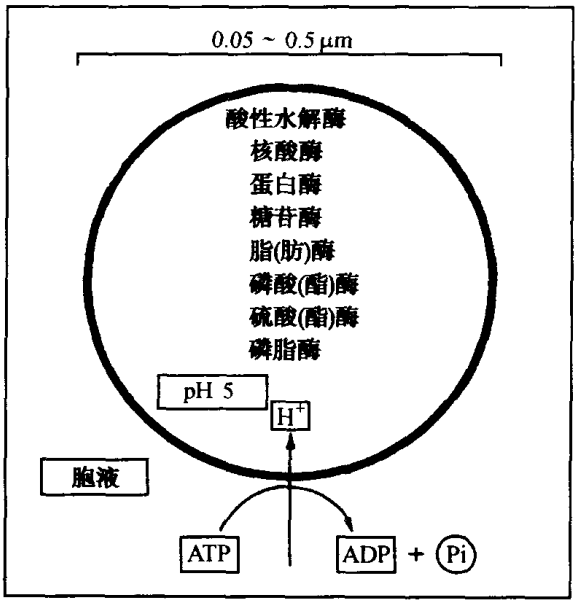


图 4－28 溶酶体结构示意图
酸性水解酶是指在酸性条件下具有活性的水解酶类。通过膜上的 H^+ ATP 酶,泵 H^+ 到溶酶体内维持其内的酸性(仿 B. Alberts, 等)

(heterophagic vacuole);如果被消化的物质是内源性的(指细胞本身的各组成分,例如衰废的线粒体、部分内质网等),则称为自体吞噬泡(autophagic vacuole)或称自噬溶酶体(autophagic lysosome)。正常情况下,在次级溶酶体内进行消化作用,如果消化完成了,形成的小分子物质可通过膜上的载体蛋白转运到细胞质中,供细胞代谢用。在这种溶酶体内,仅剩下消化不了的残渣物质,这时的溶酶体称为残留小体(residual body),或称三级溶酶体(tertiary lysosome)或后溶酶体(post-lysosome)或末期溶酶体(telolysosome)。这种残留小体有些可通过外排作用排出细胞,有些则积累在细胞内不被排出(图 4-29)。

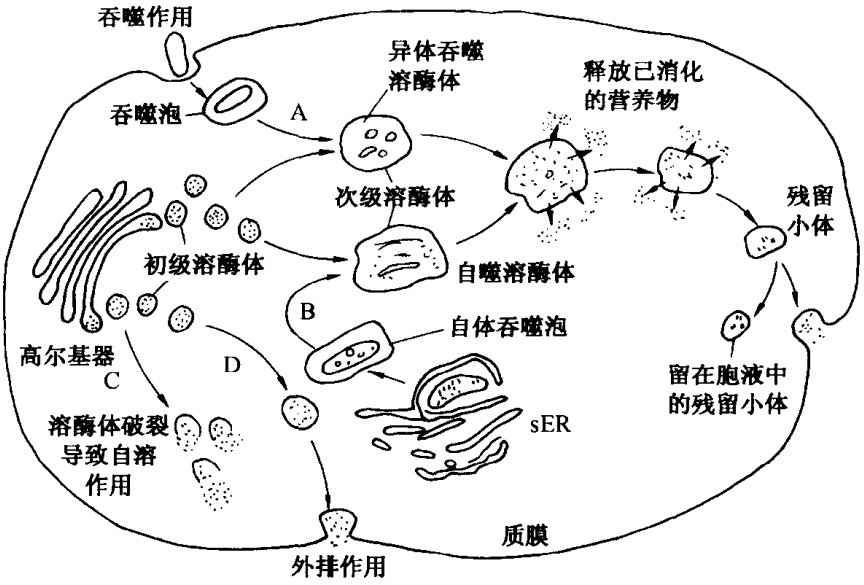


图 4-29 初级溶酶体和次级溶酶体的形成及其在细胞消化中的作用
示以下几个途径:A. 吞噬作用; B. 自体吞噬; C. 自溶作用; D. 细胞外消化作用
(仿 W.H.Becker, 等, 1996, 稍改)

4.5.2 溶酶体的形成

已知溶酶体的酶由 rER 的核蛋白体上合成后都是糖蛋白,都具有 *N*-连接的寡糖链。在顺面高尔基网的膜囊内寡糖链上的甘露糖残基磷酸化形成 M6P(图 4-30)。M6P 是溶酶体水解酶分选的重要识别信号。所有糖蛋白离开 ER 都具有 *N*-连接的寡糖链,为什么只有溶酶体水解酶的寡糖链被磷酸化形成 M6P? 这是由于在每个水解酶上有其特异的信号斑(signal patch),再通过两种酶的相继催化作用而成:首先是磷酸转移酶(phospho-transferase),其上具有特异地结合水解酶的识别位点(recognition site)和磷酸转移酶反应的催化位点(catalytic site)(图 4-31)。被识别位点所识别的信号是水解酶信号斑的构象,一旦水解酶的信号斑被识别与信号位点结合,磷酸转移酶即将 GlcNAc-磷酸加到每个寡糖链的 1 或 2 个甘露糖残基上。接着第二种酶 GlcNAc-磷酸糖苷酶(phosphoglycosidase)切去 GlcNAc 残基,形成 M6P 标记的水解酶(图 4-31、4-32)。

在反面高尔基网内具有识别 M6P 基团的受体蛋白(图 4-30),M6P 受体是一种结合膜的蛋白,为跨膜蛋白。这些 M6P 受体识别、结合具 M6P 标记的溶酶体水解酶,并包装,从反

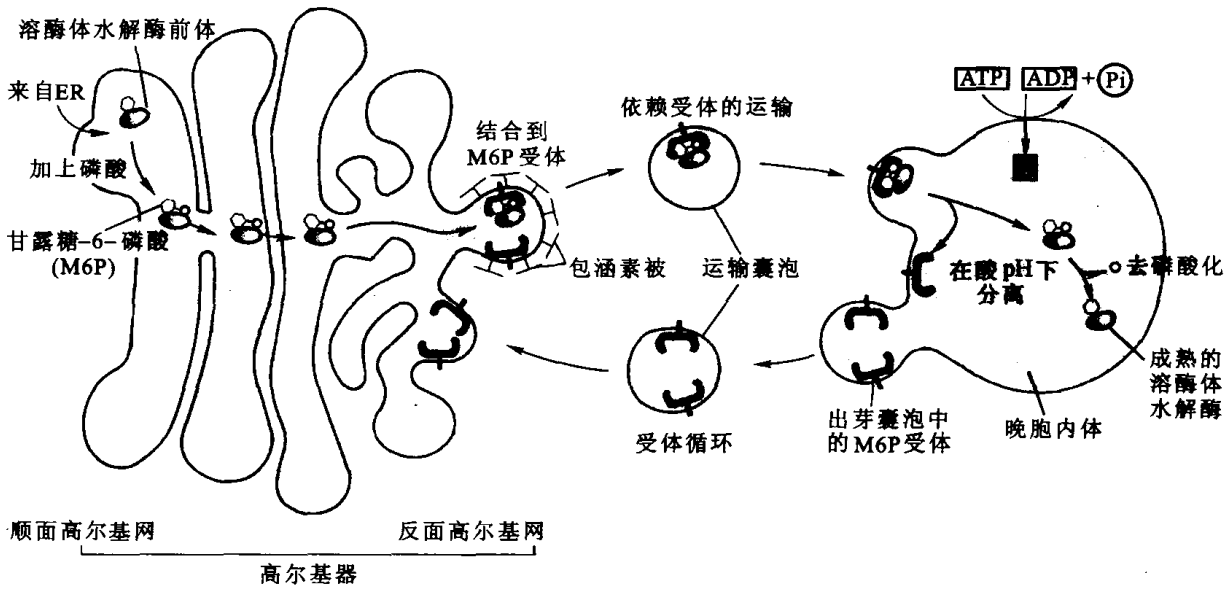


图 4-30 新合成的水解酶运输到溶酶体

来自 ER 的水解酶的前体在顺面高尔基网的膜囊内磷酸化，形成具 M6P 标记的水解酶，至高尔基器反面与其内的 M6P 受体结合，出芽形成特异运输囊泡(具包涵素被)，集中了 M6P 标记的水解酶及 M6P 受体。该运输囊泡与晚胞内体融合。在晚胞内体低 pH 条件下水解酶与受体分离，受体再循环到高尔基器再利用，水解酶上的磷酸被去除，形成成熟的溶酶体水解酶(仿 B. Alberts, 等)

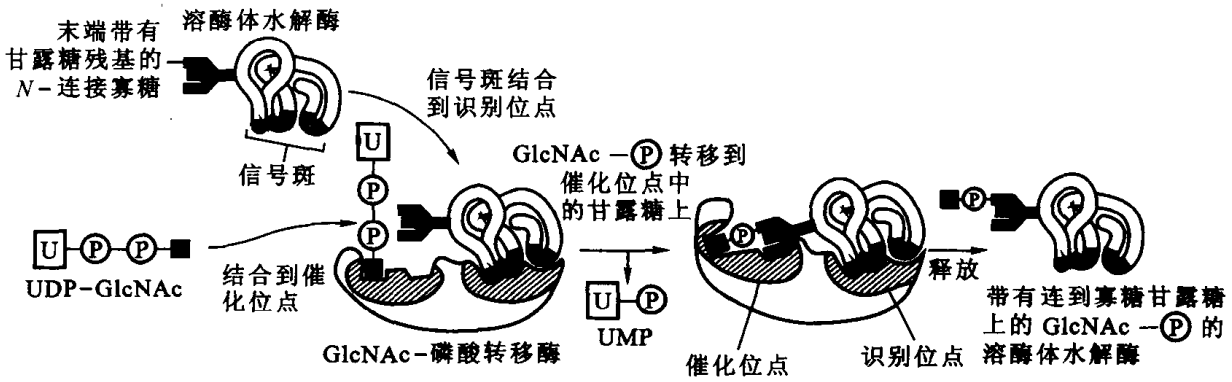


图 4-31 溶酶体水解酶的识别作用

在高尔基器中识别溶酶体水解酶的 GlcNAc－磷酸转移酶具有分开的识别位点和催化位点。识别位点与仅存在于溶酶体水解酶表面的信号斑相结合，催化位点结合高甘露糖的 N－连接寡糖链和 UDP－GlcNAc(引自 B. Alberts, 等)

面高尔基网出芽，成为特异的运输囊泡，然后与晚胞内体融合。晚胞内体内的 pH 为 6，在高尔基器的中性环境(pH 为 7)中，M6P 受体与 M6P 结合，在晚胞内体酸性环境中，二者分离，水解酶从 M6P 受体上分离下来，然后去磷酸化成为溶酶体的酶，最后形成溶酶体。M6P 受体释放其结合的酶后，又被回收，在晚胞内体经出芽、运输囊泡返回到反面高尔基网的膜，再利用。这样 M6P 受体在高尔基器和晚胞内体之间循环，认为成熟的溶酶体是从晚胞内体形成的。

有些研究者认为，从反面高尔基网出芽形成装有溶酶体水解酶的囊泡，不是与晚胞内体融合，而是在反面高尔基网出芽形成囊泡时，其膜上具有依赖于 ATP 的质子泵，泵入 H^+，

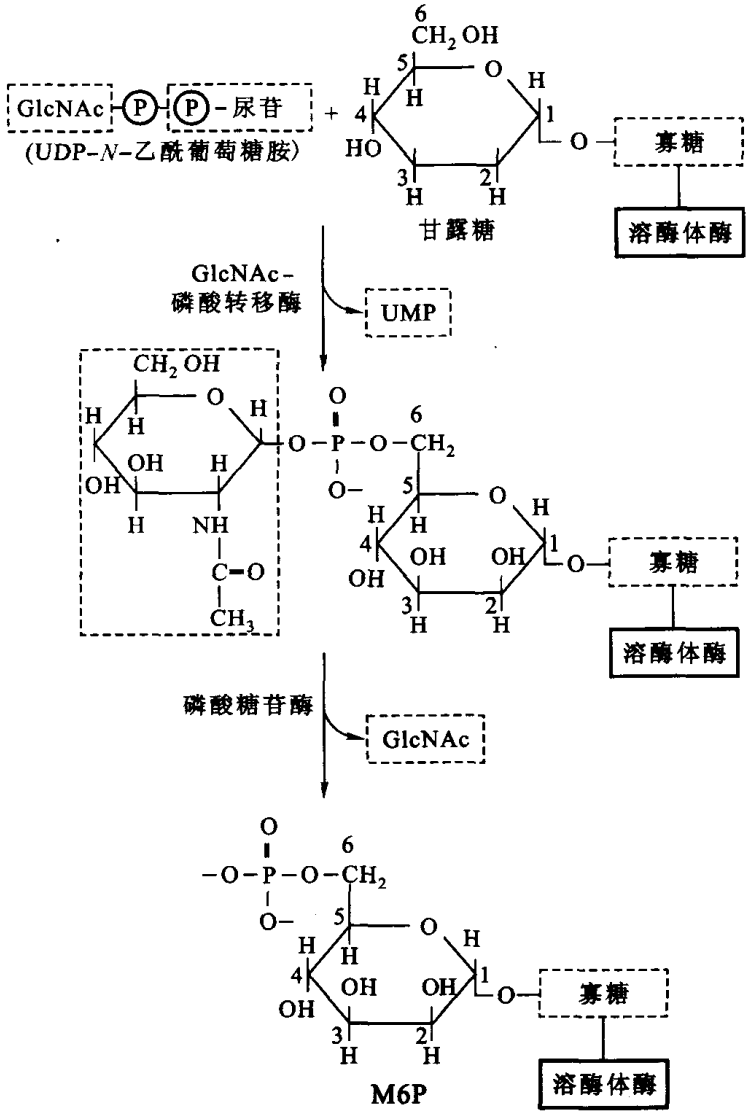


图 4－32　在溶酶体水解酶上 M6P 标记的合成

这种合成分二步：①GlcNAc－磷酸转移酶转移 GlcNAc－P 到水解酶 *N*－连接寡糖几个甘露糖的 6 位置上；②磷酸糖苷酶切去 GlcNAc，产生 M6P 标记

使囊泡内 pH 减低，引起具 M6P 标记的水解酶与 M6P 受体分离，M6P 受体再循环到高尔基器，具 M6P 的水解酶由磷酸酶去除甘露糖基团上的磷酸，形成初级溶酶体。

大部分溶酶体水解酶具有多个寡糖，它们可形成许多个 M6P 基团。这对 M6P 受体提供了很强的易于识别的信号。溶酶体水解酶典型的结合到磷酸转移酶的识别位点，其亲和常数(affinity constant，K_a)约为 10^5 L/mol，多磷酸化水解酶结合 M6P 受体的亲和常数约为 10^9 L/mol，亲和力增加了 10 000 倍。

具 M6P 标记的水解酶不是全能通过 M6P 途径到达溶酶体。有些水解酶分子逸出反面高尔基网正常的包装过程，而被运输到细胞表面，分泌到细胞外的液体中。有趣的是一些 M6P 受体也到达质膜，重新捕获逸出的酶，通过受体介导的内吞作用经胞内体将它们返回到溶酶体。这种清理途径(scavenger pathway)最初是从研究一种溶酶体水解酶遗传缺陷病(Hurlers 病)人的细胞中发现的。该病缺乏破坏葡糖胺聚糖的酶，因此在突变个体的溶酶体中聚集大量未消化的这种物质。在培养的突变个体的细胞可见到这种不正常情况。如果突变细胞与正常细胞一起培养，这种不正常性消失，这是因为它们通过清理途径获得了正常细胞放出来的、它们所缺少的溶酶体酶。这些疾病的研究对溶酶体水解酶分选机制的发现是

关键的一步。

在溶酶体中，除了水解酶外，还有一些结合于膜的酶，如葡萄糖脑苷脂酶（glycocerebrosidase）以及溶酶体膜的特异膜蛋白。这些蛋白也是在 ER 的核蛋白体上合成，经高尔基器修饰加工与分选，但其机制尚不十分清楚。

溶酶体的形成可能具有不同的途径，比如在不同细胞类型不同，或是其中的某些酶可能通过不同的方式进入溶酶体中。如酸性磷酸酶合成时是一种跨膜蛋白，它不经过 M6P 途径，而是像质膜蛋白那样，经高尔基器转运到细胞表面，然后依其胞质部分酪氨酸残基信号，从细胞表面转运到溶酶体。

此外，过去认为若干细胞类型，例如，神经元和肝细胞等，其溶酶体是通过一种特殊的称为 GERL 途径形成，GERL 的字意是 Golgi 与 ER 结合，由 ER 形成 lysosome。即直接从 ER 来的水解酶运输到高尔基器反面的一 sER 区域（与 rER 连续），由该 sER 形成溶酶体。当时对 GERL 和高尔基器间精确的结构与功能关系不十分清楚，现有学者认为 GERL 途径的 sER 区域即为反面高尔基网。

4.5.3 溶酶体的功能

溶酶体是细胞的“消化器管”。由于溶酶体内水解酶的消化作用，致使溶酶体在细胞内具有多方面的重要功能。不仅有营养防卫的功能，对细胞的生长发育、代谢调节也有重要作用。按被消化物质的来源不同，分为以下几种途径。

4.5.3.1 通过内吞作用

通过内吞作用形成吞噬泡或胞饮小泡进入细胞内，吞噬作用（phagocytosis）是内吞作用的一种特殊形式，如微小生物、细菌等经过大的内吞囊泡（吞噬泡），被摄入细胞内与初级溶酶体接近、融合，形成次级溶酶体（消化泡），在其内进行消化。消化的产物扩散到细胞质内，不能被酶消化的物质残留在膜内。在变形虫或其他原生动物，这些残渣通过外排作用排出细胞；而在其他细胞，如肝细胞的外排作用是较为缓慢或者没有，这样不断形成的残渣逐渐增多，有趋向认为这种物质的堆积会使细胞衰老。一些具有吞噬能力的细胞吞噬的异物（如细菌、病原体等）在溶酶体内消化。可见溶酶体不仅具有消化营养的功能也具有防御作用。

最近的许多研究已日益清楚，溶酶体的消化功能对细胞的营养、生长以及发育起了调节作用。在细胞中，胆固醇的主要来源是溶酶体，它水解在 LDL 中酯化的胆固醇，通过受体介导的内吞作用，有被小囊携带 LDL 颗粒进入细胞内，最后与溶酶体融合，其消化酶将胆固醇酯水解为游离的胆固醇分子，从溶酶体中释放出来，用于细胞各部分合成新膜或其他代谢过程（详见第 3 章 3.3.3.1）。许多激素的浓度也部分地受溶酶体消化活性的控制。例如，胰岛素与细胞表面受体结合，胰岛素－受体复合物在有被小囊中被内化，最后到溶酶体，在溶酶体内，胰岛素及其受体分子被降解。这样，在细胞外液中激素的浓度及细胞表面受体的浓度下降了。通过这种下行调节，细胞能对影响糖代谢的细胞内化条件发生反应。

4.5.3.2 通过自体吞噬作用

自体吞噬（autophagy）作用存在于所有细胞类型，是细胞处理本身已老化或衰废细胞器的一种途径。例如，肝细胞中线粒体的平均寿命约为 10 天，正常细胞电镜图像显示溶酶体内含有线粒体或其他细胞器（推测是在消化中）。看来这一过程从来源于 ER 的膜包围细胞

器开始，产生自体吞噬泡，然后它与溶酶体融合进行消化降解(图 4－33)。这一过程是高度有规律的，但尚不了解细胞器老化衰废到什么程度或具有何种缺陷才是转运到溶酶体降解的标志。此外，动物在饥饿时也常出现这种自体吞噬泡，如饥饿的原生动物常易见到这种现象。很显然，这种自体吞噬泡能使细胞将自身的部分物质作为营养，来更新一些必要的成分，以免致其自身永久性地死亡。

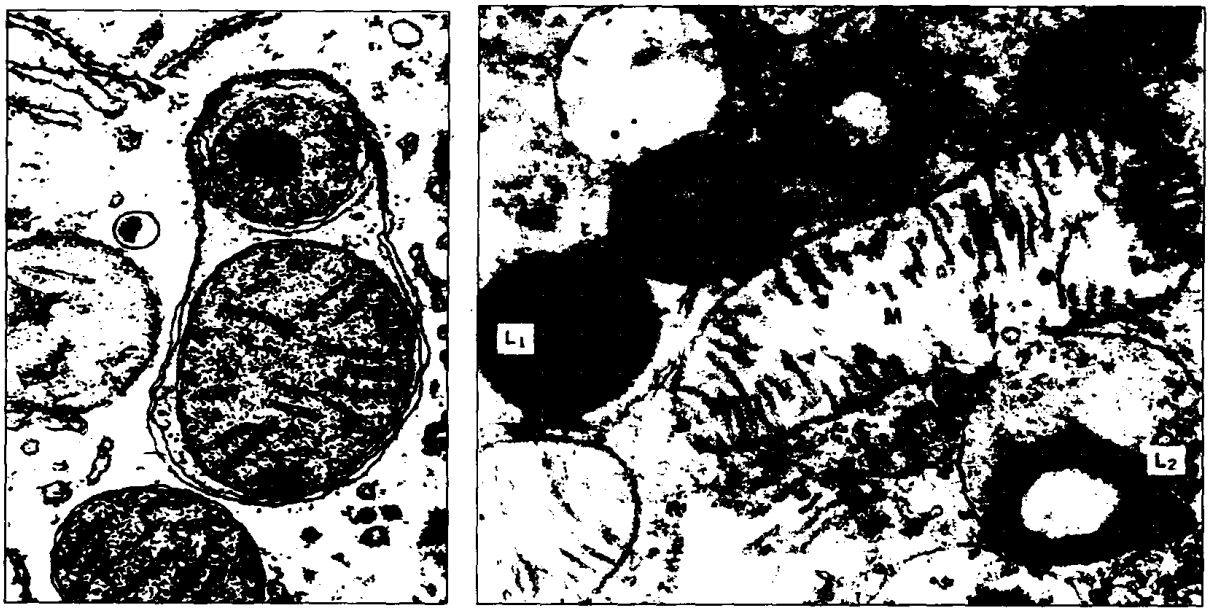


图 4－33 自体吞噬

A. 自体吞噬泡包含一个线粒体和一个过氧物酶体；B. 小鼠肾近曲小管细胞的一部分电镜照片示溶酶体(L_1, L_2)及其(L_2)与线粒体膜融合(A 引自 D. Friend；B 引自 V. Maggi)

近年的研究表明，胞液中的若干蛋白质通过另一种途径直接运输到溶酶体中降解。在胞液中，有些蛋白质的表面含有某些信号[称为 KFERQ 序列，KFERQ 代表赖氨酸(K)、苯丙氨酸(F)、谷氨酸(E)、精氨酸(R)和谷氨酰胺(Q)]，这些信号使带有它们的蛋白质能被选送到溶酶体降解。可能溶酶体膜能识别这些信号，转运这些蛋白直接横过溶酶体膜。这是一种特殊的运输。

溶酶体不是一个简单的废料站，在其中将细胞中不需要的废物降解，或溶解掉不需要的细胞。它是细胞内消化的场所，在溶酶体内将细胞内衰废的细胞器降解，将大分子消化成为小分子，如糖、氨基酸、脂肪酸、核苷酸以及在新的大分子合成中可被利用的物质。这些分解后的产物，通过溶酶体膜到胞液中，补充了胞液的代谢库，通过溶酶体的消化活性，对促进细胞生长和代谢调节有积极作用。

溶酶体对细胞生长发育的调节作用从溶酶体的自溶作用中也能充分反映出来。

4.5.3.3 通过自溶作用

自溶作用(autolysis)是指在细胞内，溶酶体膜破裂，释放出其中的水解酶，引起细胞自身的溶解、死亡，整个细胞被释放的酶所消化。在正常的机体，在个体发生过程中，器官、组织的改建形成，通常是通过组织细胞的破坏和新生实现的，虽然引起这些过程的机制尚不十分

清楚。近年的研究表明,其中涉及到程序性细胞死亡(programmed cell death)或细胞凋亡(apoptosis)问题。细胞凋亡是调节正常发育不可缺少的一种机制。从根本上说,它是受细胞内基因的调控。细胞间信号的传递也是影响细胞死亡的因素。但一般认为溶酶体也起着重要作用。溶酶体不仅使细胞崩解,且使生物的大分子分解代谢,其中一些物质又可供组织细胞再利用。如昆虫变态时幼虫组织的消失,蝌蚪变化成蛙时蝌蚪尾部的消失,都与溶酶体的作用分不开。Rodolf Luteum 的研究指出,在蝌蚪变态之前,随着尾部的缩短,溶酶体酶的活性逐渐增加(图 4-34)。已知在骨骼发生过程中,破坏骨质的破骨细胞与造骨的成骨细胞共同担负骨组织的连续改建过程,其中破骨细胞的溶酶体放出来的酶参与陈旧骨基质的吸收、消除,是骨质更新的一个重要步骤。精子的顶体(acrosome),实际是一个大的特化的溶酶体。顶体位于精子的前端,当精子质膜与围绕卵的物质接触时,精子发生反应,释放储存于顶体内的溶酶体酶,消化出一条到达卵的通路,进入卵内。

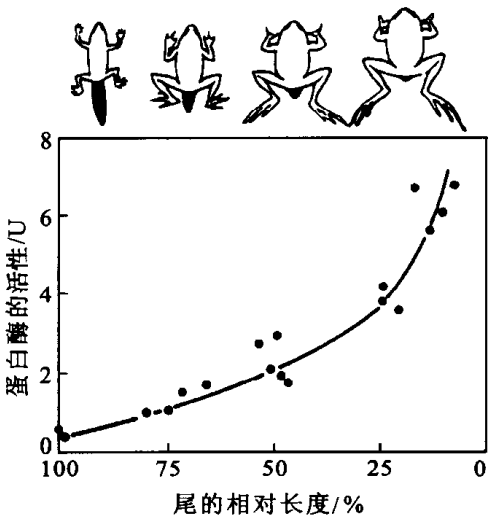


图 4-34 蝌蚪变态为成蛙,尾部消失
尾部细胞的溶解是由于溶酶体酶的消化作用,如图所示在变态时蛋白酶的活性相应增加(引自 C. J. Avers)

在不正常的生理条件下,例如,在死亡细胞内,溶酶体膜破裂得十分迅速。高等动物死亡后消化道粘膜很快就腐败,也正是由于溶酶体膜破裂所致。在多细胞动物机体正常生命过程中,一些细胞死亡后,其内的溶酶体膜破裂,对于死亡细胞的清除是有意义的。已证明当细胞突然缺乏 O_2 或受某种毒素作用时,溶酶体膜可以在细胞内破裂,其中大量的水解酶释放到细胞质中,消化了细胞自身,同时向细胞外扩散,造成组织损伤或坏死。现在已知有许多因子能增加溶酶体膜的透性,或"脆性",如孕(甾)酮(progesterone)、睾酮(testosterone)、内毒素、维生素 A 和 E、蛋白酶、毛地黄皂苷(digitonin)、胆盐等以及 X 射线、紫外线也有类似作用;另一方面,有些因子对溶酶体膜又具有稳定作用,如可的松、氢化可的松(cortisol)、胆甾醇、氯喹等。目前,有人用能稳定溶酶体膜的药物如可的松、抗组织胺类药物等进行抗炎治疗,具有一定疗效,其中对风湿性关节炎的治疗就是这个道理。

4.5.4 溶酶体与疾病

近些年来对溶酶体功能的研究已远远超出了细胞学的范围,不仅医学遗传学、实验医学,甚至临床医学中的许多问题都与溶酶体有关。

现已研究有 40 种以上的疾病是由于溶酶体中缺乏某种酶。目前所知的先天性溶酶体病都是由于先天性缺乏某种溶酶体酶以致相应的底物不能被消化,这些物质储积在次级溶酶体内,造成代谢障碍,是一种代谢性疾病,又称储积病(storage disease)。例如泰-萨二氏病(Tay Sacks 病,又名家族黑蒙性白痴),这种病的患者,在其脑组织中储积了大量的特殊的糖脂,比正常的超过 100~300 倍的神经节苷脂(ganglioside),而在组织中却失去了氨基己糖酯酶(hexos-aminidases)。该水解酶正常存在于溶酶体内,这种酶的缺乏,说明了糖脂分子

降解发生障碍。因此，神经节苷脂的过量储积是由于它的降解极度减低，而不是由于这种化合物合成的增加。另一种储积病是由于有关溶酶体酶缺乏，在患者的溶酶体内累积了蛋白多糖(proteoglycan)所致，例如 Hurler 病(或 Hunter 病)(图 4－35)。先天性溶酶体病在我国较为少见。

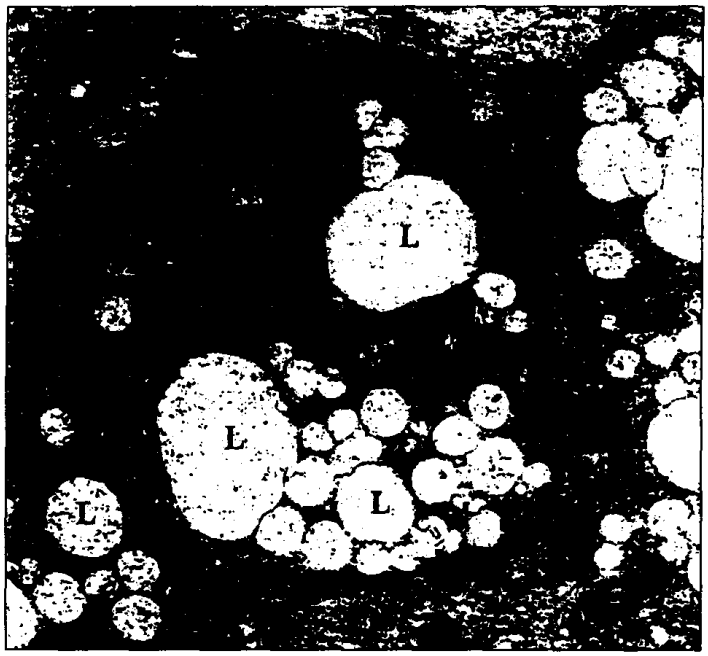


图 4－35　Hurler 病人肝组织活检切片的肝细胞电镜照片
示溶酶体(L)内充满了蛋白多糖分子；M：线粒体；N：细胞核；×5 500
(引自 Van Hoof)

有的工矿企业中有一种职业病——矽肺(cilicosis)，其病因就与溶酶体有关。当肺部吸入矽尘后，矽粉末(SiO_2)被组织中的吞噬细胞吞噬。但是溶酶体酶不能破坏矽粉末，而矽粉末能使溶酶体膜破裂，释放出其中的水解酶，引起细胞死亡，放出的矽粉末，再被健康的吞噬细胞吞噬，得到同样的结果。如此吞噬细胞相继地吞噬、死亡，最后刺激成纤维细胞，导致胶原纤维的沉积，结果是减低了肺的弹性，损伤了肺的功能。已有实验证明，矽粉末破坏溶酶体膜，是由于在矽颗粒表面形成矽酸，由酸的羟基基团与溶酶体膜的受体分子之间形成氢键引起的。如果将某种保护性的物质，即与矽酸羟基起反应的物质与 SiO_2 一起加入培养吞噬细胞的培养液中，就能够防止膜的破裂。结缔组织纤维结的形成，显然是由已死的吞噬细胞所释放的某种因子造成的。如果将被矽粉末破坏的吞噬细胞加入到成纤维细胞的培养液中，就能产生结缔组织纤维，形成纤维结。

又如石棉纤维以及一些种类的细菌(例如肺结核菌)，也不能被细胞内的溶酶体酶所破坏。常年接触石棉纤维的工人，肺中形成结缔纤维，称为石棉沉着病(asbestosis)，这种病在许多方面与矽肺相似。

近年来，溶酶体与癌的发生之间的关系已日益引起人们的注意。有人提出，溶酶体与癌的发生有关，主要论点是：①致癌物质进入细胞后，在与染色质整合之前，先储存在溶酶体内(已用放射自显影显示)；②作用于溶酶体膜的物质，有时也能诱发细胞异常分裂；③致癌物质导致细胞分裂调节机制的障碍以及染色体异常等癌变现象，可能与细胞损伤时溶酶体释放出水解酶有关。但溶酶体与癌的发生是否直接有关，尚待进一步深入研究。在治疗癌症方面，溶酶体的作用也为人们所重视。有人提出，利用溶酶体能释放水解酶消化自己及其周围细胞的特性来清除癌细胞治疗癌症。许多实验研究证明，溶酶体活化剂与抗癌药物合用，能增强抗癌药的疗效。

4.6 过氧物酶体

过氧物酶体(peroxisome)首次是由瑞典的 Johannes. A. G. Rhodin(1954)用电镜研究小鼠肾近曲小管上皮细胞时发现的,这一小细胞器直径约 0.5 μm, Rhodin 称其为微体。此后研究多集中在哺乳动物的肝和肾,陆续发现了一些氧化酶和过氧化氢酶存在于微体中。1965 年, C. de Duve 建议把微体命名为过氧物酶体。这一术语已被人们普遍接受。过氧物酶体是真核细胞广泛存在的一种细胞器。

过氧物酶体,也有称为过氧化酶体、过氧化氢体、过氧小体或微体(micro body)。植物细胞的过氧物酶体也称为乙醛酸体。

4.6.1 过氧物酶体的结构与功能

过氧物酶体是由一个单位膜包裹的卵圆形或圆形小体,其中含有极细的颗粒状物质,中央常有一高密度的核心,此核心是尿酸氧化酶(urate oxidase)有规则的结晶(图 4－36)。人、鸟类及四膜虫等的过氧物酶体不含有尿酸氧化酶,没有核心。从鼠肝细胞定量研究得知,过氧物酶体直径平均为 0.6～0.7 μm,每个肝细胞中平均有 70～100 个。在哺乳动物中,只有几种器官(如肝、肾)有典型的过氧物酶体,且过氧化氢酶的量比其他组织高得多。在各种细胞内都有少量的过氧化氢酶。这些酶,有些存在于具膜的小颗粒(直径约 0.1～0.2 μm)内。

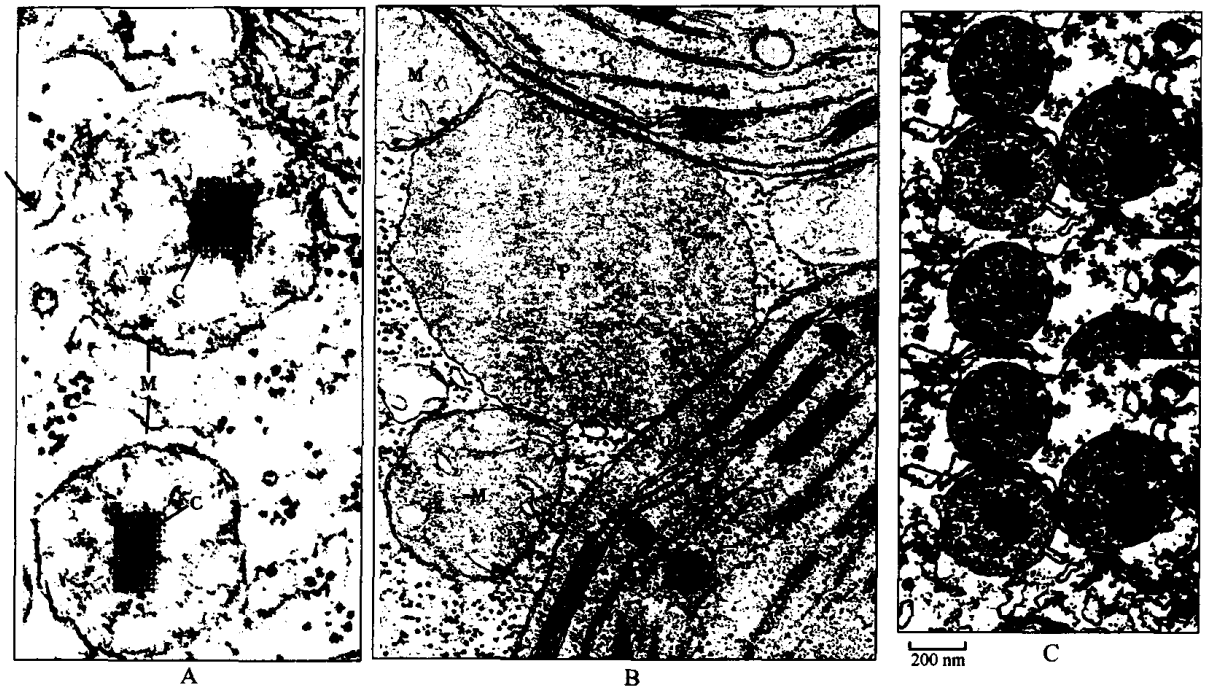


图 4－36 过氧物酶体的电镜照片

A. 燕麦细胞过氧物酶体电镜照片,示核心结构,其界膜(M)与 ER 膜相连(箭头), ×7 500; B. 烟草叶片细胞过氧物酶体插在两个叶绿体之间并与线粒体毗邻。这 3 种细胞器紧密相连有利于形成一代谢途径:在叶绿体内形成的乙醇酸被氧化成过氧物酶体中的乙醛酸,接下去在线粒体内发生的反应和返回到过氧物酶体中的反应导致在叶绿体内形成糖, ×50 000; C. 大鼠肝细胞的过氧物酶体电镜照片示电子致密的核心为尿酸氧化酶(A 和 B 引自 Frederick, 等;C 引自 D. S. Friend)

Alex 和 P. M. Novikoff 等命名这些颗粒为微过氧物酶体。有证据表明,其中有氧化酶,其功能与过氧物酶体一致。

根据新近的研究,过氧物酶体是一种多功能的细胞器,含有 50 余种酶,具不同的活性,如能氧化极长链脂肪酸(very - long - chain fatty acids)、在肝细胞胆固醇和胆汁酸的合成、脑组织中一类重要的磷脂——缩醛磷脂(plasmalogens)的合成以及虫萤光素酶(luciferase,它产生萤火虫发的光)也是过氧物酶体的一种酶。但普遍大量存在于过氧物酶体的是,多种催化生成过氧化氢的氧化酶(如氨基酸氧化酶、α 羟基酸氧化酶、尿酸氧化酶等),以及分解过氧化氢的过氧化氢酶。但迄今尚未发现一种过氧物酶体含有全部 50 多种酶,其中过氧化氢酶存在于各种细胞的过氧物酶体中。因此,可以说过氧化氢酶为此种细胞器的特征性的酶。各种氧化酶约占过氧物酶体总量的 60%。

过氧物酶体的氧化酶利用分子氧在氧化反应中脱去特异有机底物上的 H 原子,产生氢的过氧化物——H_2O_2($RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$),过氧化氢酶又利用 H_2O_2 通过氧化反应($H_2O_2 + RH_2 \rightarrow R' + 2H_2O$)去氧化其他各种底物,包括酚、甲醛、甲酸和醇等。这种类型的氧化反应在肝和肾细胞中特别重要,因为过氧物酶体可去除进入血流中的各种有毒性分子,人们饮用乙醇的 1/4 是以这种方式氧化成乙醛;细胞中累积的过氧化氢,过氧化氢酶也将其转化为水($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$)。因此氧化酶和过氧化氢酶合在一起的作用,可以认为是形成简单的呼吸链(图 4 - 37),从其上各种代谢物脱下的电子最终与氧形成水。这种呼吸链与线粒体的不同,它不与腺苷三磷酸(ATP)的磷酸化作用偶联,而受过氧化氢的协调。

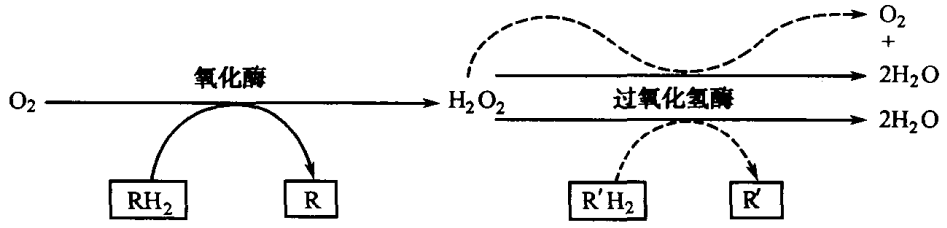


图 4 - 37 过氧物酶体中的呼吸链

各种氧化酶之氧化底物(RH_2)使底物将电子交给氧,形成过氧化氢(H_2O_2),过氧化氢再被过氧化氢酶还原成水。还原的电子来自许多种小分子的一种($R'H_2$),如无其他供体,则来自过氧化氢本身(引自 C. de Duve)

在过氧物酶体中,进行氧化反应的主要功能是破坏脂肪酸分子。在 β 氧化过程中分解脂肪酸,使其转化为乙酰 CoA,并运到胞液中以备在生物合成反应中再利用。在哺乳动物细胞中的 β 氧化,发生在线粒体和过氧物酶体中;在酵母和植物细胞中,这种反应仅存在于过氧物酶体。此外,已经实验证明,大鼠肝的过氧物酶体内存在 β 氧化酶,服用降脂灵后浓度增加 10 倍以上,其他降低血脂的药物,甚至有些结构上与降脂灵毫不相同的药物也都有相同的作用。高脂肪食物或受凉都能诱导过氧物酶体的 β 氧化系统,增强了脂肪酸的氧化,确证了它对脂肪代谢的作用。

过氧物酶体不仅是一种高度异质性的细胞器(在同一有机体不同细胞中可含有不同组的酶),而且也能明显地适应于变化的条件。例如,酵母细胞生长在糖水中具有很小的过氧物酶体;当它们生活在甲醇的环境中,其过氧物酶体氧化甲醇,发育为大的过氧物酶体;当生

长在脂肪酸中，它们通过 β 氧化，发育为大的过氧物酶体破坏脂肪酸，成为乙酰 CoA 的过氧物酶体。

植物的过氧物酶体，也称为乙醛酸体(glyoxysome)，有很重要的作用。已广泛地研究了两种不同类型的过氧物酶体：一种类型存在于植物叶中，它催化固定 CO_2 于糖类副产物的氧化作用，这一过程称为光呼吸作用(photorespiration)；另一种类型存在于萌发的种子中，它对转化储存于种子脂类中的脂肪酸成为幼小植物生长所需要的糖类，起了必不可少的作用。将脂肪转化为糖是通过乙醛酸循环(glyoxylate cycle)完成的。在此乙醛酸循环中，脂肪酸分解所产生的乙酰 CoA 与草酰乙酸缩合形成柠檬酸，再通过乙醛酸循环中一系列酶的作用，转变为葡萄糖。

4.6.2 过氧物酶体的发生

过去一般认为过氧物酶体的蛋白质是在 rER 的核蛋白体上合成的，然后移至 ER 腔内，通过 ER 腔转移到一定部位，从 ER 部分扩张出芽后脱落下形成过氧物酶体，其内充满了电子密度大的物质。已报道观察到过氧物酶体与 ER 之间的连续性(图 4－38)。用电镜组织

图 4－38 过氧物酶体与 ER 相连续的电镜照片

A. 大鼠肝细胞的一部分电镜照片，示过氧物酶体(P)，切片的切面未包括核心结构，过氧物酶体膜明显地与 ER 膜连接，箭头：sER，×60 000；B. 1～7 为微过氧物酶体，它们聚集在一个小区域，ER(大部分是 sER)也接近它出现。ER 弯扭，微过氧物酶体的界膜不规则，不易看到二者的连续性，×37 000；C. 为 B 细胞的一部分，用改进的方法制备，过氧物酶体与 ER 关系较清楚，×44 000 (A、B 引自 Novikoff；C 引自 L. Biempica)

化学方法观察胚胎细胞，了解到过氧物酶体是在 ER 的核蛋白体上合成，从 ER 转运出来大约 1 h 内完成，一般约经历 4～5 d 被自噬作用破坏掉。

现在，有实验证明，过氧物酶体基质的蛋白质是在胞液中游离的核蛋白体上合成的。Lazarow 等以放射性同位素标记的氨基酸喂动物，在肝细胞可溶性部分看到了全部的新合成的过氧物酶体的蛋白质。当时认为蛋白质从胞液移至过氧物酶体的发现，也不排斥这种细胞器的膜可能来源于 ER，甚至继续吸附在 ER 上。认为可能过氧物酶体的膜蛋白在游离核蛋白体上合成后被插到先存的过氧物酶体的膜内。进一步的实验证明，有一短信号序列指导在胞液中合成的蛋白质输入到过氧物酶体。在许多过氧物酶体蛋白近羧基端有一特异的 3 个氨基酸序列(－Ser－Lys－Leu)是输入信号。在过氧物酶体膜的胞液面具有识别该输入信号的受体蛋白，识别蛋白质上的信号而被输入。如果将这一信号序列连到胞液中的蛋白上，这种蛋白便被输入到过氧物酶体。现已发现至少有 2 种以上的信号序列，有几种膜的受体蛋白。过氧物酶体的膜脂是由 ER 合成，通过磷脂调换蛋白输入的。这种输入过程和过氧物酶体的重要性是通过人的遗传病 Zellweger 综合征得到证实的。这种病缺乏输入蛋白到过氧物酶体，导致严重的过氧物酶体缺陷。该病人的细胞内含有“空”的过氧物酶体，其脑、肝和肾严重异常，生后不久即死亡。此病的一种形式已被表明是由于编码过氧物酶体整合膜蛋白(称为过氧物酶体组装因子－1)的基因突变引起的。现在也有证据提出，新的过氧物酶体是从已存在的过氧物酶体通过生长与分裂形成的(图 4－39)。

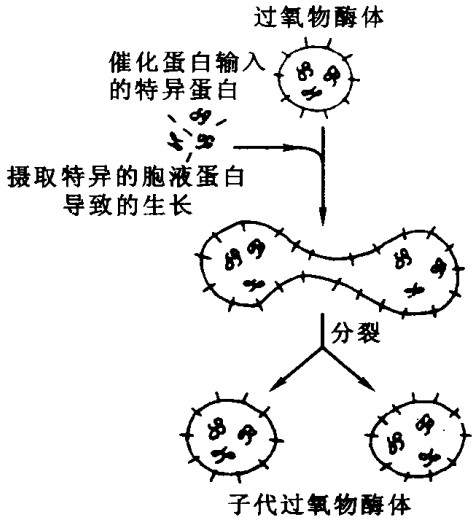


图 4－39 过氧物酶体组装、分裂示意图 过氧物酶体膜包含特异输入受体蛋白，所有过氧物酶体蛋白，包括输入受体的新拷贝都是在胞液的核蛋白体上合成的，然后输入到细胞器。这样，仅通过已存在的过氧物酶体经过生长、分裂形成新的过氧物酶体(引自 B. Alberts, 等)

以上这些已为多数学者所认可。但是现在的问题是，过去已有实验证据的过氧物酶体来自于 ER 出芽形成的结论，应如何理解？它是否是过氧物酶体发生的另一途径，或有何特异性？肯定或否定均待证实。

内 容 提 要

内膜系统为真核细胞所特有。它包括细胞内在结构、功能或发生上相互联系的有界膜的细胞器，如 ER、高尔基器、胞内体、溶酶体、过氧物酶体、线粒体、叶绿体与核被膜等。对这些细胞器，现在有些学者称其为房室。

一般蛋白质的合成起始于胞液中的核蛋白体上(线粒体、叶绿体例外)，其后根据其氨基酸序列中的分选信号被指导到其他部位；没有分选信号的则保留在胞液中。蛋白质在房室之间的运输有 3 个基本途径：孔门运输、跨膜运输和囊泡运输，并至少通过两种类型的分选信号：信号肽和信号斑。

胞液(细胞质基质)是细胞质中在细胞器和内含物之外，呈均质半透明的液态胶状物质，

其中含有多种大、中、小分子，并有多种酶系。水分子(约占 70%)多以水化物形式结合在蛋白等大分子表面，仅部分游离；多数蛋白包括水溶性的不是以溶解状态存在，而是直接或间接与细胞质骨架结合或与生物膜结合。已有实验证明，胞液是一种高度有序的复杂的结构体系，高效有序地完成多种复杂的代谢活动，代谢途径之间协调一致，以完成涉及物质、信息和能量的定向转移和传递等复杂的生命过程。已证明蛋白质的合成一般起始于胞液，然后根据其自身携带的信号进行分选和转运。

胞液的另一功能与细胞质骨架有关，对维持细胞的形态、运动、细胞内的物质运输以及能量传递等有重要作用，也为其他成分和细胞器提供了锚定点。此外，胞液对蛋白质的修饰、控制蛋白质寿命、对蛋白质选择性降解，以及帮助变性或错误折叠的蛋白质重新折叠成正常的分子构象等方面，都具有重要作用。

内质网是内膜系统中的重要房室，是蛋白质从胞液到一些细胞器(高尔基器、胞内体、溶酶体、ER)及质膜的进入点。内质网是由膜所形成的一些形状大小不同的小管、小囊和扁囊连成的网状结构。在不同类型细胞，ER 的形态、数量和分布不同；即使同一种细胞，不同发育时期、生理机能不同，ER 也不一样，但在成熟的各类型细胞，ER 有一定的形态特征。根据 ER 的形态及其表面有无核蛋白体，分为 rER 和 sER 两种基本类型。rER 是在 ER 扁囊表面有核蛋白体，普遍存在于分泌蛋白的细胞中。核蛋白体有大小亚基，为蛋白质合成的场所，除了结合于 ER 膜外，许多游离于胞液中。在胞液中有共同的核蛋白体库用于蛋白合成。在 ER 合成的蛋白有 2 类：①形成跨膜蛋白；②合成水溶性蛋白。游离核蛋白体合成核基因组编码的所有其他蛋白。未分化细胞或分裂旺盛的细胞游离核蛋白体较多。sER 的 ER 膜上无核蛋白体，ER 的单位成分为小管小囊连接成网，广泛存在于分泌类固醇的细胞，除肝细胞外大多数细胞 sER 不多，仅有转移成分的区域为 sER。sER 是一种多功能性结构。

ER 在细胞生活中有多种重要功能。它对细胞多种重要蛋白(包括酶、抗体蛋白)的合成、加工修饰、转运或输出细胞方面有作用：通过 SRP 及 SRP 受体的相互作用协助 ER 信号肽指导游离核蛋白体到 ER 膜，并通过协同翻译的转移使生长的多肽链穿过 ER 膜上的转移器进入 ER 腔；也有少数小的蛋白前体在蛋白合成后转移到 ER 腔；在 ER 腔中通过一类伴娘蛋白(属 ER 驻留蛋白)催化协助进行折叠和组装，或帮助未正确折叠或未组装好的蛋白亚单位重新折叠和组装；还能对进入 ER 腔中的蛋白进行不同的修饰。

进入 ER 的蛋白有些释放到 ER 腔，有些则整合到 ER 膜中。通过新生肽链协同翻译的插入，停止转移肽留在膜中，或者是内信号肽留在膜中成为单次跨膜蛋白；或者内信号肽与停止转移肽都留在 ER 膜成为双次跨膜蛋白；如二者各为两个以上则形成多次跨膜蛋白。ER 膜是大部分细胞器和质膜所有跨膜蛋白合成的场所，也是脂类合成的重要场所，大部分膜脂双层是在 ER 组装的，ER 膜能合成几乎所有膜的脂类。由 ER 膜合成的磷脂通过囊泡运输至高尔基器、溶酶体和胞内体以及质膜；而运输至线粒体和叶绿体则通过磷脂调换蛋白进行。此外 sER 还能合成某些类型的脂类(如类固醇)；肝细胞中还能合成脂蛋白等。对糖类代谢，ER 参加部分糖原分解，而与糖原合成无关。在肝细胞 ER(更多的是 sER)存在与解毒作用有关的酶系。

高尔基器也是内膜系统中的重要房室，在 ER 中合成的蛋白质进入生物合成分泌途径。高尔基器是来自 ER 产物的加工、分选和发送站，也是糖类合成的主要场所。高尔基器的形态、大小、分布在不同类细胞有很大差异。电镜下可见高尔基器是由光滑膜所形成的扁平囊

堆叠在一起形成的，在其周围常结合有小管小囊相连成网和大小不同的囊泡。在许多细胞中，高尔基器的扁囊堆常明显具一凸面(顺面)和一凹面(反面)。这两个面的形态、化学组成、功能以及与其他膜成分的结合是不同的。

高尔基器的功能：它不仅参与细胞的分泌过程，且对分泌的糖蛋白和其他的糖蛋白具有修饰加工、分类包装以供转运的作用。高尔基器也是糖类生物合成的主要场所，如完成糖蛋白的合成、多糖的合成，以及氨基多糖的硫酸化等。已知糖蛋白具有 N－连接的寡糖链，也有具 O－连接的寡糖。后一类糖蛋白主要或全部是在高尔基器内完成的。而 N－连接的寡糖的糖蛋白合成开始于 ER 腔内，完成糖蛋白的合成是在高尔基器内。密度梯度离心及转移酶的单克隆抗体免疫细胞化学电镜研究指出，高尔基器扁囊堆至少可分 3 个区隔，各由 1 个或多个扁囊组成，每个区隔中含有修饰蛋白质的一些特定的酶，要正确加工修饰某种蛋白需依次通过各区隔。区隔化为寡糖的加工修饰提供了方便，对分类运输蛋白也有作用。

蛋白质从 ER 运输至高尔基器，并从高尔基器到细胞表面或细胞器(如溶酶体、胞内体)，都是通过运输囊泡进行的。从 ER 的特化区域(转移成分)出芽形成小囊至高尔基器。从 ER 到高尔基器是通过 COPⅡ被囊泡运输，COPⅡ被对可溶蛋白有选择和浓缩作用。从 ER 出口的蛋白必须是正确折叠和组装的，否则在 ER 内最后被降解。正确折叠的蛋白质被运输出 ER 不需要特异信号，而那些在 ER 腔的 ER 驻留蛋白如 Bip，却有 ER 保留信号，如果它们逃逸到运输囊泡里，到高尔基器顺面由结合膜的相应受体捕捉形成运输囊泡，通过 COPⅠ被囊泡从高尔基器返回到 ER。

溶酶体，一般认为它是由高尔基器形成的，是细胞内消化的主要场所。溶酶体的形态大小差异很大，光镜下成为可见的小颗粒。用电镜细胞化学法显示，溶酶体由一个单位膜包围，其内有多种水解酶，这些酶在酸性(pH 5)环境中能分解蛋白质、核酸、多糖及脂类等，分解的产物经膜上的运输蛋白扩散到胞液中。溶酶体膜上有质子泵，能将 H^+ 泵入溶酶体以维持其酸性 pH。构成溶酶体膜的蛋白质高度糖基化，可保护膜免受膜内蛋白酶的消化。溶酶体在发育和生理功能的不同阶段，形态、名称不同(如初级溶酶体、次级溶酶体即消化泡、吞噬溶酶体，又分为自体吞噬泡、异体吞噬泡及残留小体)。

已知溶酶体的酶在 rER 合成后，糖基化，形成 N－连接寡糖的糖蛋白，由于在酶上有信号斑，在高尔基器顺面区隔内寡糖链上的甘露糖残基磷酸化，形成 M6P 标记的溶酶体酶，至反面高尔基网，M6P 与其受体结合并包装，从反面高尔基器出芽脱落成为特异运输囊泡，然后与晚胞内体融合，在其内(pH 6)M6P 与其受体分开，M6P 受体又返回高尔基器膜，再利用；具 M6P 的酶去磷酸化，最后形成溶酶体。对此有人认为不经胞内体，从高尔基器反面出芽形成的囊泡，形成初级溶酶体。溶酶体的形成可能具有不同的途径。

溶酶体的功能，主要是溶酶体内水解酶的消化作用，通过内吞作用、自体吞噬作用和自溶作用，完成多方面重要功能，不仅有营养、防卫的功能，而且对细胞的生长发育、代谢调节也有重要作用。此外，溶酶体与疾病也有关系。

过氧物酶体，在电镜下呈圆形或卵圆形小体，外包以一个单位膜，其中含极细的颗粒物，中央常有一高密度的核心(为尿酸氧化酶结晶)，有些(人、鸟类及四膜虫等)则无此核心。还发现有呈小颗粒状的微过氧物酶体。过氧物酶体是一种多功能的细胞器，含有多种酶。其中普遍大量存在的是多种催化生成过氧化氢的氧化酶及分解过氧化氢的过氧化氢酶。已知有 50 多种酶，但尚未发现一种过氧物酶体含有全部 50 多种酶。在同一机体不同类细胞中

含有不同组的酶，但过氧化氢酶存在于各种细胞的过氧物酶体中。因此过氧化氢酶为其特征性的酶。过氧物酶体可清除进入血流中的各种有毒性的分子。在过氧物酶体中进行氧化的重要功能之一，是由β氧化酶使脂肪酸氧化分解，使其转化为乙酰 CoA，运至胞液以备生物合成时再利用。植物的过氧物酶体已广泛研究的有两种不同类型：①参加光呼吸作用；②将脂肪酸转化为糖是通过乙醛酸循环完成的。

过氧物酶体的发生：过去一般认为过氧物酶体的蛋白是在 rER 上合成后移至 ER 腔，到 ER 的一定部位，膨大脱落形成的，许多电镜照片显示过氧物酶体与 ER 的连续性。现在有实验证明，过氧物酶体基质蛋白是在胞液中游离核蛋白体上合成的，有一短的信号序列（近羧基端有 3 个氨基酸序列：Ser－Lys－Leu）指导蛋白到过氧物酶体。也有证据表明，新的过氧物酶体是从已存在的过氧物酶体通过生长与分裂形成的。以上两种发生方式各有实验根据，是自然存在的，还是其他什么原因，有待研究。

思 考 题

1. 什么是内膜系统？它包括哪些细胞器？细胞器与房室的涵义有何异同？细胞房室化对细胞代谢有何意义，举例说明蛋白质在房室化中的重要作用。
2. 简要说明细胞内蛋白质运输的 3 个基本途径，并举例说明分选信号如何指导蛋白质的运输。信号肽与信号斑有何不同？
3. 如何理解胞液是一种高度有序的复杂的结构体系？简要说明胞液对细胞的物质代谢以及控制蛋白质寿命方面的重要作用。
4. 根据 ER 的形态结构，如何区分 rER 和 sER？它们的主要功能有何不同？
5. 简要说明 ER 在细胞生活中有哪些重要功能，并说明在胞液中核蛋白体上开始合成的蛋白质如何结合于 rER 进行蛋白质的合成、转移，进入 ER 腔的蛋白如何进行加工修饰，转移的蛋白质又如何整合于 ER 膜；扼要说明单次跨膜蛋白和多次跨膜蛋白的整合机制。
6. 在 ER 合成的多肽链进入 ER 腔后大部分进行糖基化，在 ER 腔内蛋白质糖基化的特点是什么？ER 对脂类合成或糖原分解有何作用？在肝细胞内主要是哪种类型的 ER 有解毒作用？通过什么作用使一些药物或毒物失去其毒性？
7. 从高尔基器的形态结构，说明高等动物的高尔基器和无脊椎动物、植物的有何共同特征，又有何不同。如何说明高尔基器具有极性？
8. 高尔基器在细胞生活中有何重要功能？试举例加以简要说明。
9. 高尔基器是糖蛋白合成的主要场所，在高尔基器内糖蛋白的合成有何特点？它与在 ER 中糖蛋白的合成有何不同？结合一些研究实验结果，分析说明糖蛋白合成的一些重要步骤及催化其反应的酶各存在于哪些区隔。
10. 高尔基器是来自 ER 产物的分选场所和发送站，试以溶酶体酶为例，说明它在高尔基器内是如何被分选的。
11. 在 rER 上蛋白质合成后从 ER 运输至高尔基器，并从高尔基器到细胞表面或其他部位都是通过运输囊泡进行的。为什么 ER 驻留蛋白被排出到运输囊泡后会被遣返回 ER？
12. 溶酶体内含有多种水解酶，为什么溶酶体膜不被消化，为什么即使有少量溶酶体酶漏出到细胞质中胞质也不致于被降解？试说明其原因。
13. 初级溶酶体、次级溶酶体、三级溶酶体（残留小体）、吞噬溶酶体及自噬溶酶体各有何特点？又有何关系？

14. 溶酶体一般认为是由高尔基器形成的，但有不同看法，你对此如何分析？
15. 溶酶体是细胞内的“消化器官”，它的功能是多方面的，试从通过内吞作用、自体吞噬和自溶作用三方面分析其对细胞作用的多方面功能，并举例说明溶酶体与疾病的关系。
16. 过氧物酶体的标志酶是什么？它是一种有界膜的圆形或卵圆形小体，怎么能说明它是一种高度异质性的细胞器？人和鸟类的过氧物酶体与其他动物的有何不同？
17. 过氧物酶体中的呼吸链与线粒体呼吸链的主要区别是什么？植物的过氧物酶体的作用与动物的有何不同。
18. 过氧物酶体的发生，就你已知的两种方式，各有实验根据，你对此如何分析？

参 考 资 料

1. 汪堃仁，薛绍白，柳惠图主编. 细胞生物学. 第 2 版. 北京：北京师范大学出版社，1998. 110～165
2. 翟中和，王喜忠，丁明孝主编. 细胞生物学. 北京：高等教育出版社. 2000. 158～206
3. Alberts B, Bray D, Johnson A, *et al*. Essential Cell Biology. New York and London: Garland Publishing Inc, 1998. 447～480
4. Alberts B, Bray D, Lewis J, *et al*. Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. New York and London: Garland Publishing Inc, 1994. 551～618
5. Karp G. Cell and Molecular Biology. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 1999. 292～343
6. Kleinsmith L J, Kish V M. Principles of Cell and Molecular Biology. 2nd ed. Harper Collins College Publishers, 1995. 286～307
7. Becker W M, Reecr J B, Poenie M F. The World of the Cell. 3rd ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1996. 254～264
8. Lodish H, Baltimore D, Berk A, *et al*. Molecular Cell Biology. 3rd ed. New York and London: Scientific American Books Inc, 1995. 173～175, 708～710
9. Van Winkle, Lon J, Bussolati O. Biomembrane Transprot. San Diego: Academic Press, 1999
10. Farquhar M G, Palade G E. The Golgi Apparatus: 100 years of progress and controversy. Trends in Cell Biology, 1998: 2～10
11. Lloyd J B, Mason R W. Biology of the Lysosome. New York: Plenum Press, 1996
12. Master C J, Crane D. The Peroxisome: a vital organelle. New York: Cambridge University Press, 1995

第5章

线粒体与叶绿体

细胞活动的能量主要来自 ATP。在真核细胞中，少量 ATP 产生于糖酵解过程，但是大多数 ATP 的形成是在线粒体(mitochondrion)和叶绿体(chloroplast)细胞器中。线粒体和叶绿体是细胞内两个能量转换的细胞器。线粒体广泛存在于真核细胞中，而叶绿体存在于植物细胞中。本章主要介绍线粒体和叶绿体的结构、功能及其在遗传学上有关自主性的分析等。

5.1 线粒体

线粒体是细胞中重要和独特的细胞器。在线粒体中通过氧化磷酸化作用，将生物体所摄取的糖、蛋白质、脂肪等营养物质氧化分解，并进一步将食物中储藏的能量转化为化学能，不断供给生物体生理活动的需要。因此，线粒体也被认为是生物体内的“动力工厂”。

5.1.1 线粒体的形态、大小、数量和分布

线粒体的外形多种多样，它的变化与细胞类型和所处生理条件密切相关，但在大多数细胞中，最常见的是呈线状或颗粒状，其他有呈哑铃状、环形、圆柱形及蛇形等。线粒体的大小也随不同细胞类型而异，通常直径为 0.5～1 μm，长 2～3 μm 左右，但也有的线粒体较大，称之为巨型线粒体，可见于一些骨骼肌中。线粒体的大小因外界环境条件的变化(如渗透压、温度、酸碱度等)产生变异，可塑性较大。在一些细胞中，当线粒体在细胞质中移动时，显示出与微管的联系(图 5－1)。

线粒体的数目在不同类型的细胞中差异很大，一般动物细胞中存在数百个到数千个，但有一种巨大变形虫，一个细胞中甚至有多达 50 万个线粒体。线粒体数目也表现出与细胞生理功能与需求有关。一般情况下，需要能量较多的细胞，线粒体数目也较多，飞翔鸟类的胸肌细胞线粒体的数量远高于不飞翔鸟类的胸肌细胞。同样的，线粒体的分布也显示出与能量相关的特性。如在一些肌细胞中，线粒体被包装在邻近的肌原纤维中间，以保证肌肉收缩时能量最快速地供给(图 5－2)。又如在精子细胞尾部，线粒体围绕鞭毛中轴的周围(图 5－3)，由这些线粒体产生的 ATP 作为精子运动的动力来源。

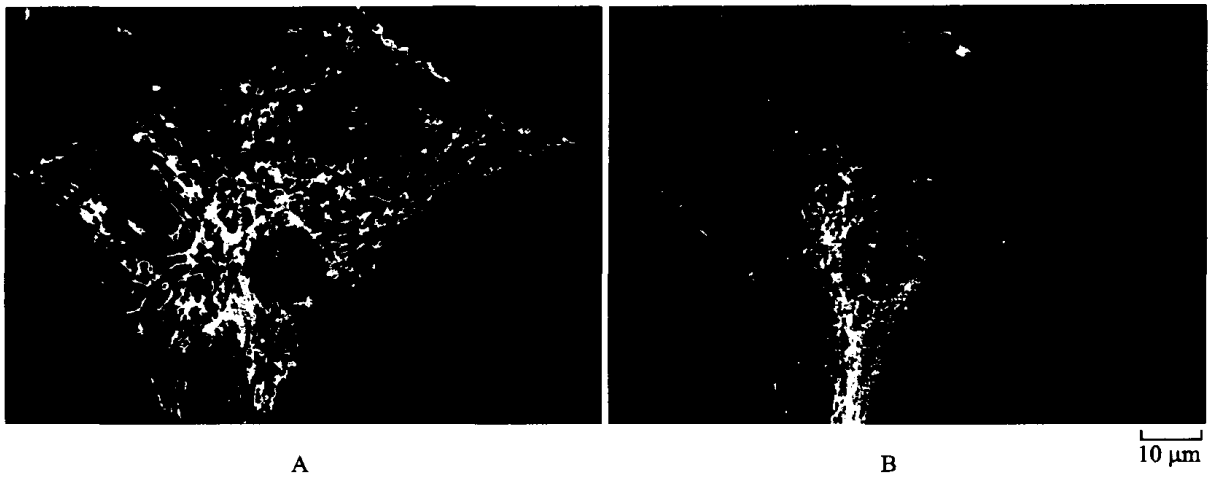


图 5－1　光学显微镜图显示线粒体与微管相关性

A. 组织培养的哺乳动物细胞中被罗丹明(Rhodamine)染色的一连串延伸的线粒体；

B. 在同一细胞中荧光染色的微管表现出线粒体沿微管排列(引自 Lan Bo Chen)

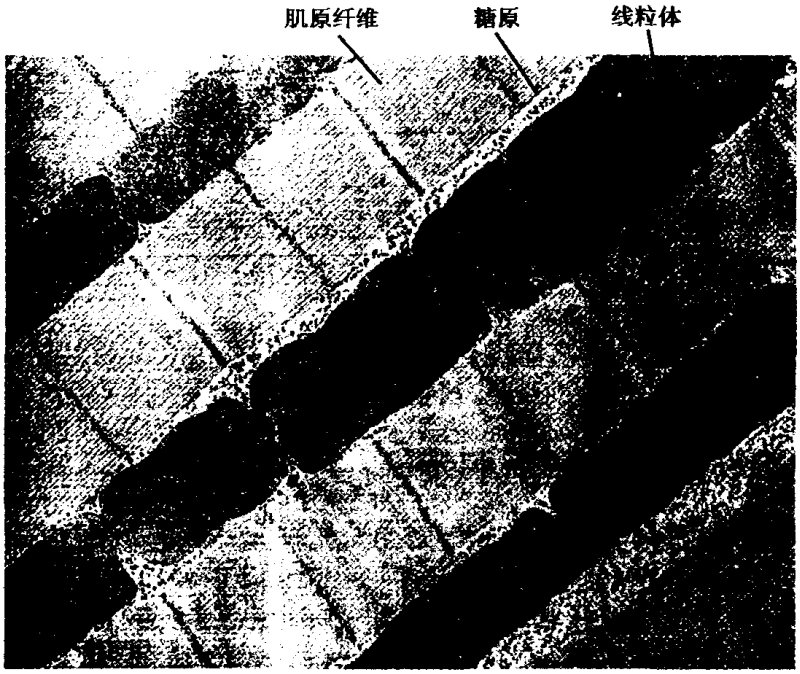


图 5－2　果蝇飞翔肌切片电镜图示线粒体被包装在邻近的肌原纤维中间

(引自 S.J.O'Brien)

图 5－3　电镜图示狨猴的精子细胞中线粒体沿精子细胞尾部鞭毛高度有序、成簇排列(引自 W.M.Baker, 1986)

5.1.2 线粒体的结构

电镜下观察，每个线粒体具有一个由内、外两层单位膜构成的封闭的囊状结构，主要由外膜、内膜、膜间隙和基质组成(图 5－4)。

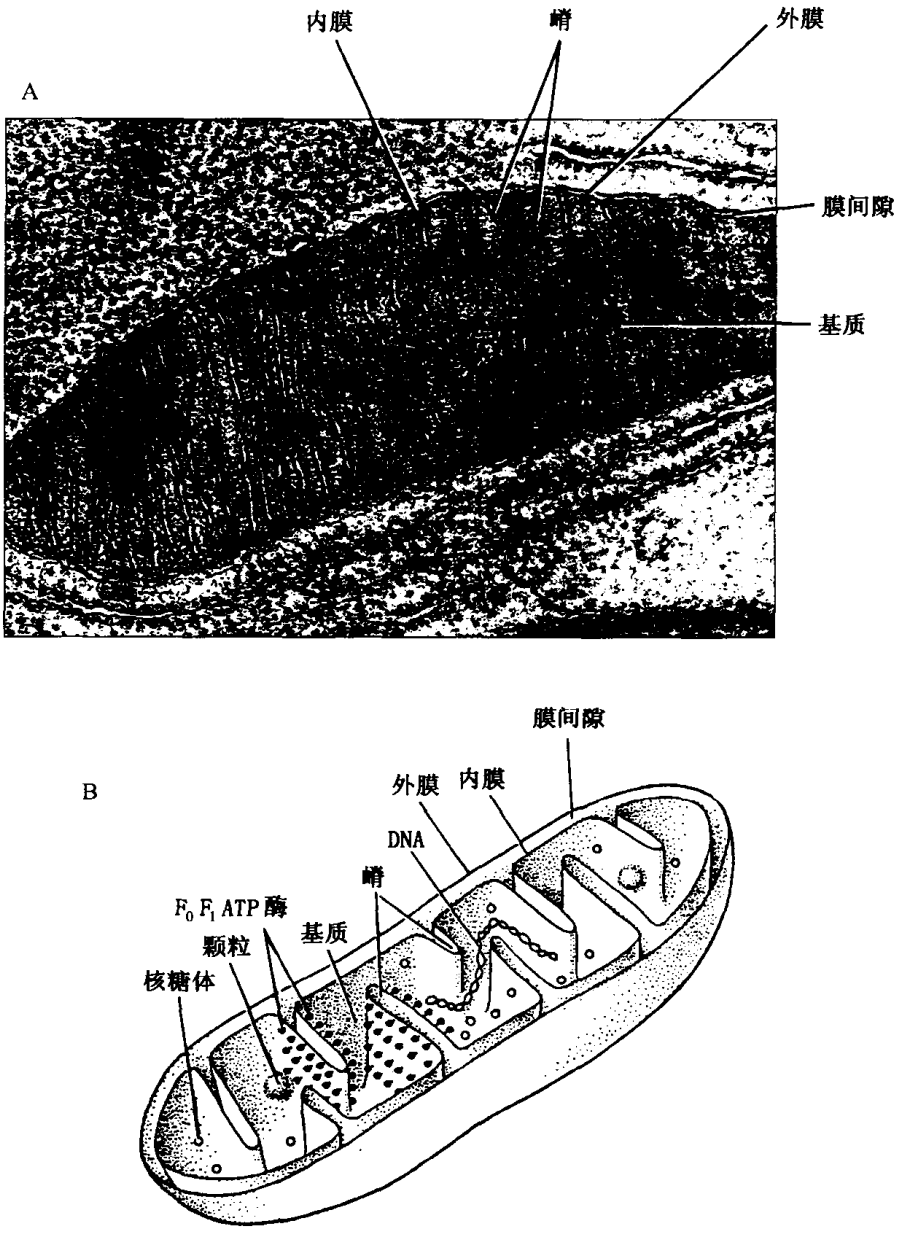


图 5－4 线粒体结构

A. 蝙蝠胰脏线粒体电镜图(引自 D. W. Fawcett, 1981)；B. 线粒体三维结构模式图

1. 外膜(outer membrane)：外膜具有单位膜的结构，厚约 6 nm，平整、光滑。外膜包含有许多形成通道的蛋白(channel－forming protein)，即孔蛋白(porin)。外膜允许相对分子质量为 5×10^3 以下的分子通过它进入膜间隙。在外膜上有其他蛋白，如合成线粒体脂类的酶类等。

2. 内膜(inner membrane)：与外膜相似，内膜也具有单位膜的结构，厚约 6 nm，内膜渗

透性很差，大分子通过内膜进入基质需要特殊的转运系统，离子和大多数带电的小分子是不能渗透的。内膜向线粒体腔内突出皱褶形成嵴(cristae)，其厚度与内膜相似。嵴是线粒体很重要的特殊结构，它使内膜的表面积明显扩增，在完成线粒体的功能中起重要作用。不同类型的细胞，嵴的形状、排列方式与数目有很大差异，一般说，需要能量较多的细胞(如心肌细胞)线粒体中富含排列紧密的嵴。嵴内面为不光滑的膜结构，在膜上覆盖有很多称为基粒(elementary particle)的圆球形颗粒(详细结构与功能见后)。从能量转换的角度来说，内膜起主要作用。

3. 膜间隙(intermembrane space)：膜间隙指线粒体内、外膜之间的腔隙，它延伸到嵴的轴心部。腔隙宽约 6～8 nm。由于内、外膜紧密相附，因此膜间隙体积较小，但在活跃呼吸条件下，该空间扩大，基质空间减少。膜间隙内含一些可溶性酶类及辅助因子等。

4. 基质(matrix)：线粒体内膜的内侧和嵴之间的空间为基质，内含很多蛋白质和脂类。线粒体中催化三羧酸循环、丙酮酸和脂肪酸氧化等酶类都存在于基质中，此外还含有线粒体基因组 DNA、特定的线粒体核糖体、tRNA、线粒体基因表达和蛋白质合成需要的多种酶类。除上述内含物外，基质中存在有电子密度很大的致密的颗粒状物质，内含 Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+} 等离子。

5.1.3 线粒体的功能与氧化磷酸化

线粒体是糖、脂肪和氨基酸最终氧化释放能量的场所。糖和脂肪等营养物质在细胞质中经过酵解作用产生丙酮酸和脂肪酸，这些物质选择性地从细胞质进入到线粒体基质中，经过一系列变化和降解后与辅酶 A(CoA)结合形成乙酰辅酶 A(乙酰 CoA)进入三羧酸循环，三羧酸循环中脱下的氢经线粒体内膜上的电子传递系统，最后传递给 O_2。在此过程中，能量水平较高的电子，经过电子传递降至较低能量水平，所释放的能量以含高能磷酸键的 ATP 形式储存于体内。因此，不难看出，参加三羧酸循环中的氧化反应、进行电子传递和能量转换是线粒体的主要功能(图 5－5)。

5.1.3.1 氧化磷酸化作用的分子基础

1. 呼吸链(电子传递链)的组成：由 NADH 至 O_2 的呼吸链(respiratory chain)又称电子传递链(electron－transport chain)，主要包含黄素相关的脱氢酶(flavinlinked dehydrogenases)或称为黄素蛋白(flavoprotein)、铁硫蛋白(iron－sulfur protein)、泛醌或辅酶 Q(ubiquinone 或 CoQ)、细胞色素(cytochrome, Cyt)。NADH 是介于三羧酸循环和线粒体内膜之间的主要媒介物。以 NAD^+ 为辅酶的脱氢酶催化代谢物质脱氢后，NAD^+ 被还原为 NADH，同时生成一个 H^+。NADH 将它的两个电子和一个质子传递给黄素单核苷酸(FMN)，开始了呼吸链电子传递过程。

在呼吸链的组成中，黄素相关的脱氢酶系有两种：以黄素单核苷酸(FMN)为辅基的 NADH 脱氢酶和以黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)为辅基的琥珀酸脱氢酶。铁硫中心(iron－sulfur centers, FeS, 亦称铁硫蛋白) 作为电子传递体的组分已发现有多种，分子中含非血红素铁和对酸不稳定的硫，常见的是 2Fe2S 和 4Fe4S 两种类型，铁硫中心的作用是通过 Fe^{2+}—Fe^{3+} 互变进行电子传递。铁硫中心虽然含有多个铁原子，但是每个铁硫中心一次仅传递一个电子。辅酶 Q 是疏水的、脂溶性的相对分子质量较小的化合物。它有 3 种结构状

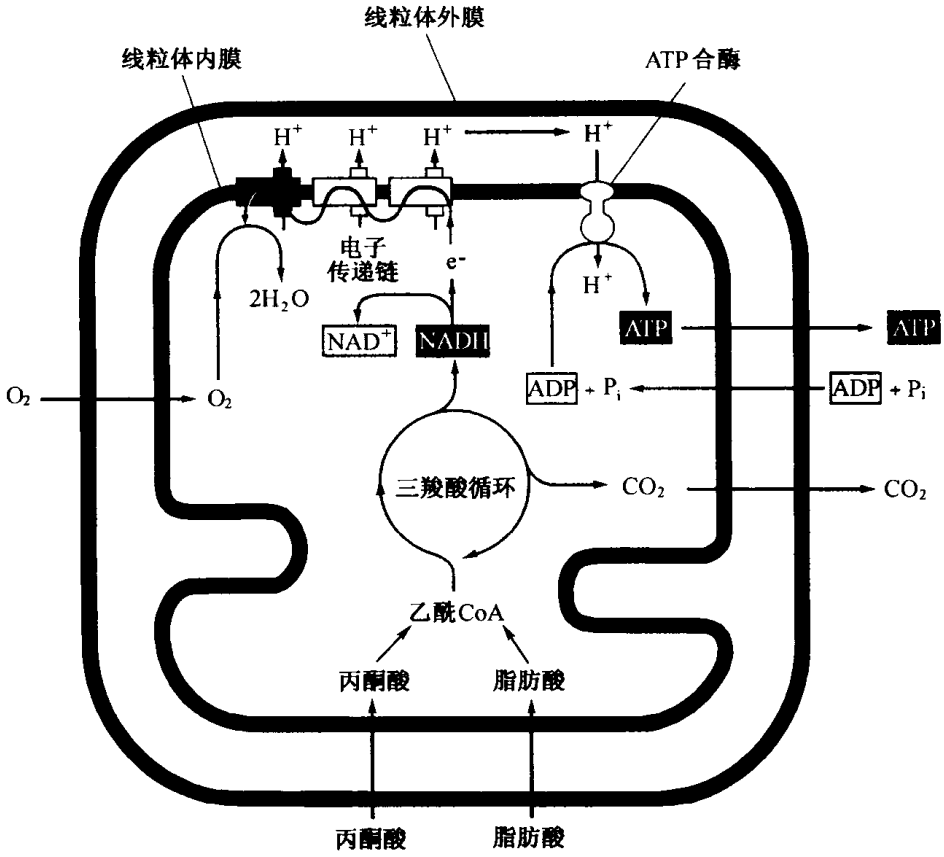


图 5－5 线粒体中能量发生的代谢过程简图

丙酮酸和脂肪酸进入线粒体。丙酮酸通过氧化脱羧，脂肪酸经 β 氧化作用等生成的乙酰 CoA 进一步参加三羧酸循环，将 NAD^+ 还原为 NADH(FAD^+ 形成 $FADH_2$，未显示)，在氧化磷酸化过程中，高能量电子从 NADH(和 $FADH_2$)沿内膜呼吸链电子传递系统传递至 O_2。呼吸链(电子传递链)横跨内膜产生质子梯度，在 ATP 合酶的作用下，驱动产生 ATP。细胞质内经酵解作用产生的 NADH 可通过穿梭系统进入基质参与电子传递链电子传递(引自 B. Alberts, 等, 1998)

态：氧化型辅酶 Q(CoQ 或 Q)，还原型辅酶 Q($CoQH_2$ 或 QH_2)和介于两者之间的自由基半醌(QH)。由于辅酶 Q 具有高度疏水性，故能在线粒体内膜的疏水区中迅速扩散，它是呼吸链中的 1 个不牢固结合于蛋白质上的、作为一种特殊灵活的载体发挥作用。它在呼吸链中处于中心地位。细胞色素是一类含铁的电子传递体。它们都以血红素(heme)作为辅基，存在于血红素中的铁以氧化态(Fe^{3+})与还原态(Fe^{2+})的形式发挥其电子传递体的作用。呼吸链中的细胞色素蛋白至少有 5 种，即细胞色素 b、c、c_1、a、a_3。它们大部分和线粒体内膜紧密结合，但细胞色素 c 结合较松弛，与其他细胞色素蛋白比较，其相对分子质量较小(1.3×10^4)。细胞色素 a 和 a_3 以复合物形式存在，被称为细胞色素氧化酶(又称细胞色素 c 氧化酶)。它是呼吸链中最后一个载体。该酶除含铁外，还含有铜原子。通过上述细胞色素辅基血红素中 Fe 可逆地被氧化还原，最后将电子传递给 O_2，生成氧离子，与 $2H^+$ 结合成 H_2O。实验表明，上述呼吸链(电子传递链)组分，除辅酶 Q 和细胞色素 c 外，均以多分子复合物的形式包埋在线粒体内膜中，现已知形成 4 个含氧化还原酶与其辅基的复合物(表 5－1)。这 4 个复合物在呼吸链中的排列顺序如图 5－6 所示。

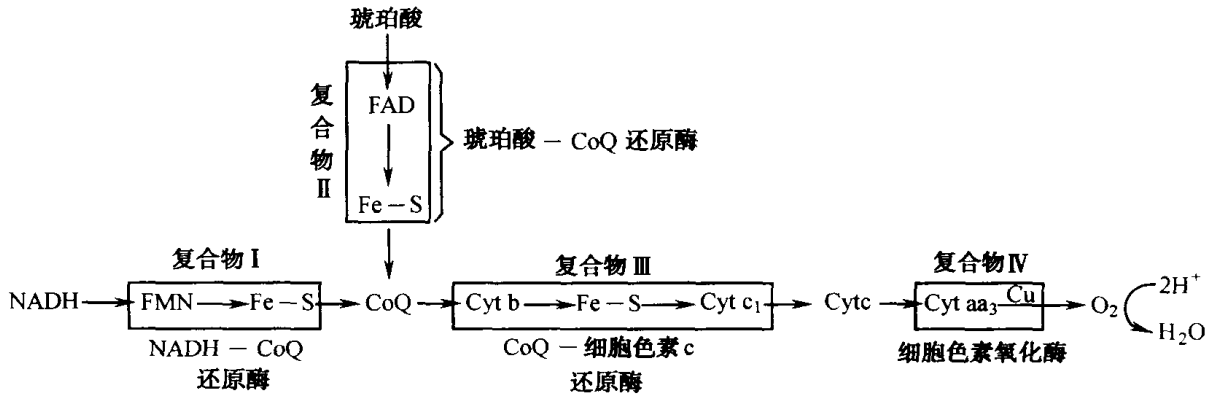


图 5－6　线粒体呼吸链组分的排列顺序
框中表示 4 个酶复合物

表 5－1　线粒体呼吸链(电子传递链)的组分

	酶复合物	辅　基	亚基数
Ⅰ	NADH－CoQ 还原酶 (NADH 脱氢酶)	FMN FeS	＞30
Ⅱ	琥珀酸－CoQ 还原酶 (琥珀酸脱氢酶)	FAD, Heme b FeS	4～5
Ⅲ	CoQ－细胞色素 c 还原酶 (细胞色素 b－c_1 复合物)	heme b 562, heme b 566 heme c_1, FeS	11
Ⅳ	细胞色素氧化酶	heme a, heme a_3, Cu_A, Cu_B	13
	细胞色素 c	heme c	1

材料来源于 J. W. Depiere 和 L. Ernster (1977); Y. Hatefi(1985); B. Alberts(1994); G. L. Zubay(1999)

复合物Ⅰ(NADH－CoQ 还原酶,又名 NADH 脱氢酶复合物)至少由 30 条多肽链组成,含有黄素单核苷酸(FMN)和至少 6 个铁硫中心,以二聚体形式存在。该复合物的作用是催化 NADH 脱氢氧化,将电子通过铁硫中心传递给 CoQ,同时,使质子移位从基质侧面至细胞质侧面,故也是质子移位体。

复合物Ⅱ(琥珀酸－CoQ 还原酶,又名琥珀酸脱氢酶复合物)至少由 4～5 条多肽链组成,含有黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、铁硫中心和细胞色素 b。复合物Ⅱ作用是催化琥珀酸氧化,同时将电子通过铁硫中心传递给 CoQ。

复合物Ⅲ(CoQ－细胞色素 c 还原酶,又名细胞色素 b－c_1 复合物)一般由 11 条多肽链组成,以二聚体形式存在,含有细胞色素 b、细胞色素 c_1 和铁硫中心。其作用是将还原型 CoQ 氧化,并将电子交给细胞色素 c,同时发生质子的跨膜转移,故也是质子移位体。

复合物Ⅳ(细胞色素氧化酶)由 13 条多肽链组成,以二聚体形式存在,该复合物含有细胞色素 a、a_3 和铜离子。其作用是将从还原型细胞色素 c 提供的电子传递给 O_2,将 O_2 还原为 H_2O。在该电子传递过程中,除铁离子外,铜离子也参与电子传递。它横跨线粒体内膜,突出于内膜两侧表面。大量实验表明它也是质子移位体。在呼吸链中 CoQ 和细胞色素 c 是在不同复合物之间可流动的氢或电子传递体。

实验表明，呼吸链(电子传递链)各组分排列是高度有序的。从 NADH 到分子 O_2 之间的电子传递过程中，电子是按氧化还原电位从低向高传递的。如图 5－7 所示，NAD^+/NADH的氧化还原电位最低($E'_0 = -0.32$ V)，O_2/H_2O 的氧化还原电位最高($E'_0 = +0.82$ V)。通过实验显示出，呼吸链在 3 个部位有较大的自由能变化，这 3 个部位是呼吸链中能量释放和 ATP 形成的偶联部位。部位Ⅰ在 NADH 和 CoQ 之间的位置；部位Ⅱ在细胞色素 b 和细胞色素 c 之间的位置；部位Ⅲ在细胞色素 a 和 O_2 之间的位置。因此，苹果酸和异柠檬酸等代谢物能使 NAD^+ 还原为 NADH，后者通过呼吸链传递至 O_2，同时可形成 3 个 ATP 分子，即 P/O =3.0。而琥珀酸等通过琥珀酸脱氢酶起始电子传递至 O_2，只能形成 2 个 ATP 分子，即 P/O= 2.0。已有资料表明，一些化学试剂可以抑制氧化磷酸化作用，或者使氧化与磷酸化发生解偶联作用，如鱼藤酮(抑制 NADH 脱氢酶的电子传递)、抗霉素 A(抑制 CoQ－细胞色素 c 还原酶的电子传递)、氰化物、叠氮钠(抑制细胞色素氧化酶的电子传递)等。

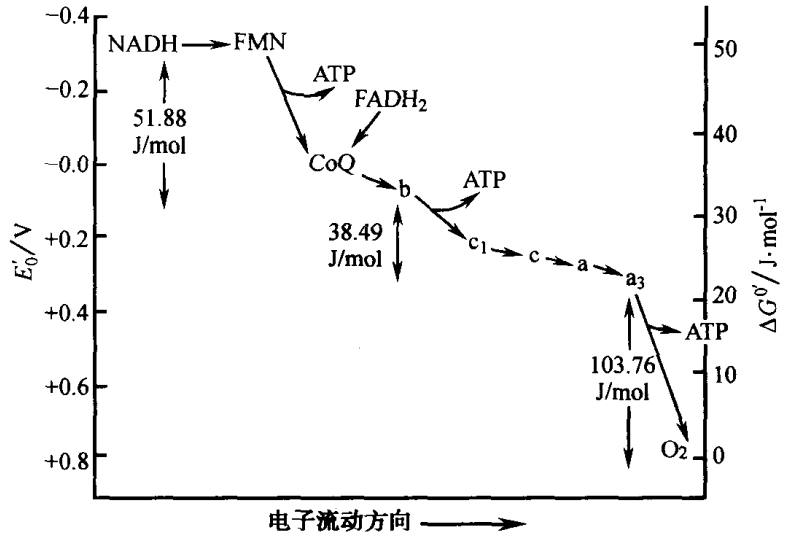


图 5－7 NADH 和 $FADH_2$ 沿呼吸链传递至 O_2 分子的电子传递次序

电子传递体从 NADH 到 O_2 按照还原电势大小的排列顺序，右侧表示各成分被 O_2 氧化时释放的标准自由能

2．ATP 合酶(ATP synthase)：美国 Racker 等实验室在进行氧化磷酸化偶联因子的研究中，用超声波处理线粒体，一些被打碎为片段的嵴膜又重新封闭形成“内膜外翻”的囊泡，该囊泡又被称为亚线粒体颗粒(submitochondrial particles)。该颗粒使得原来与基质接触的嵴膜各部分翻在外面，原来与内外膜间隔或嵴膜间隔的部分翻至内面，这种亚线粒体颗粒能进行氧化磷酸化，可用于内膜上呼吸链各组分的定位。当亚线粒体颗粒用尿素处理后，导致靠近基质内侧的颗粒消失时，这时该颗粒虽能氧化底物但不能使 ADP 磷酸化，但在含有这些颗粒的上清液中表现出可溶性 ATP 酶的活性，在一定条件下，将这些颗粒重新组装到失去颗粒的亚线粒体的内膜上时，颗粒进行氧化磷酸化的活力也被恢复(图 5－8)。上述实验证明了这些存在于线粒体内膜上的颗粒是氧化磷酸化的偶联因子，是 ATP 合酶的组成成分。它是个复合物，因为该复合物还具有水解 ATP 的功能，故也被称为可溶性 F_1 ATP 酶(简称 F_1 因子)。已有研究表明，ATP 合酶是一个可逆的偶联装置，它可利用质子动力势合成 ATP，又可利用 ATP 水解的能量将质子由基质中泵出内膜(图 5－9)。

进一步研究表明，ATP 合酶是一个大的多亚基的蛋白质复合物，由头部、柄部(stalk)、膜部组成，一般认为它是由水溶性蛋白质 F_1 和疏水性蛋白质 F_0 所组成，故亦名 F_0F_1 ATPase(图 5－10)。F_1 是构成 ATP 合酶头部的成分，其外形似一个棒糖状的头，凸出于线

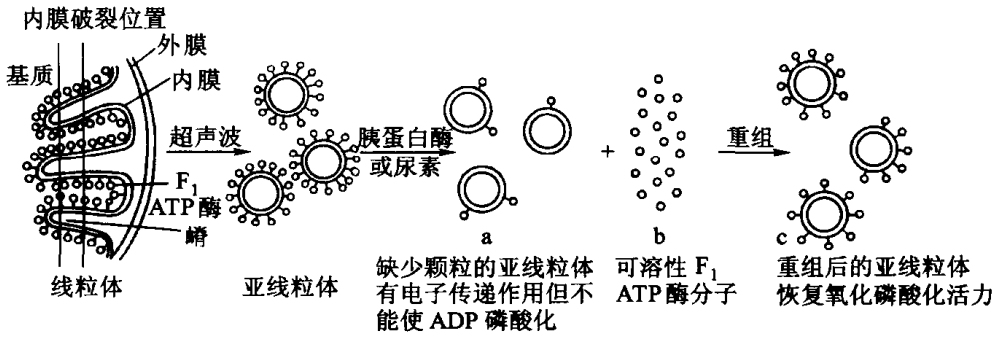


图 5－8　亚线粒体颗粒的制备和进一步拆离重组及与氧化磷酸化作用关系示意图

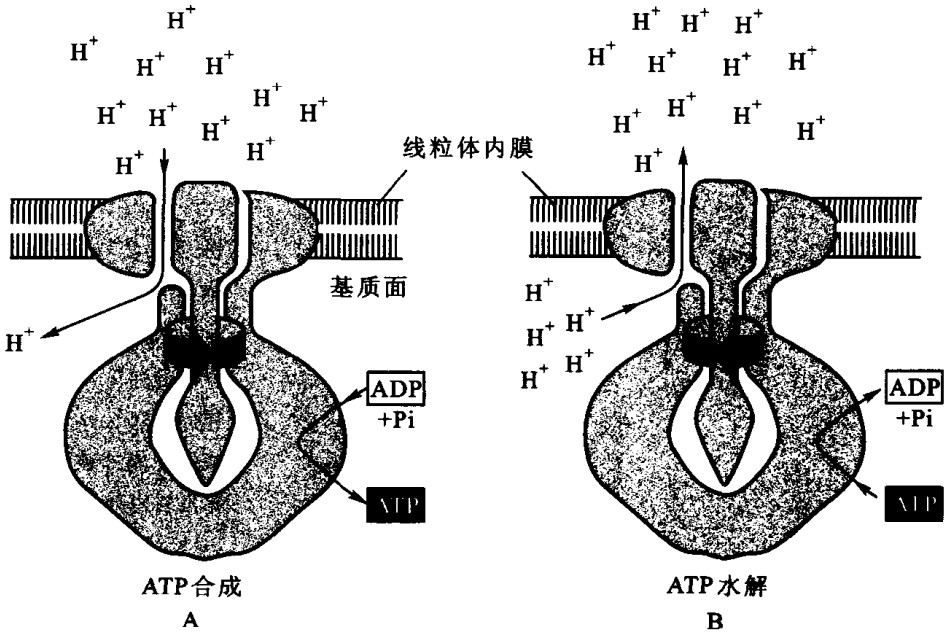


图 5－9　ATP 合酶是可逆的偶联装置示意图

A. ATP 合酶可通过利用质子梯度合成 ATP；B. 通过水解 ATP 泵出质子。上述两种情况取决于质子跨膜移位，以及 ADP 和 Pi 合成 ATP 偶联过程净自由能的变化(ΔG)，如果电化学质子梯度下降至一定水平，质子(H^+)转运入基质不再足以驱使 ATP 产生时，这时 ATP 将被 ATP 合酶水解去重建梯度(引自 B. Alberts, 1998)

粒体内膜的基质侧。它由 5 种多肽(α、β、γ、δ、ε)形成 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ 的复合物，它们有一定的排列次序。其中 α 和 β 亚基是结合 ATP 或其他核苷酸的位点；γ 亚基可能是形成高亲和性 ATP 结合位点所必需，它可能是从 F_0 的质子通道到 F_1 催化位点的主要构象传递者；δ 亚基与 F_1 紧密结合，δ 亚基与 ε 亚基可能在 F_1-F_0 结合中起作用。F_1 通过柄部蛋白质与膜结合。F_0 是构成膜部的成分，

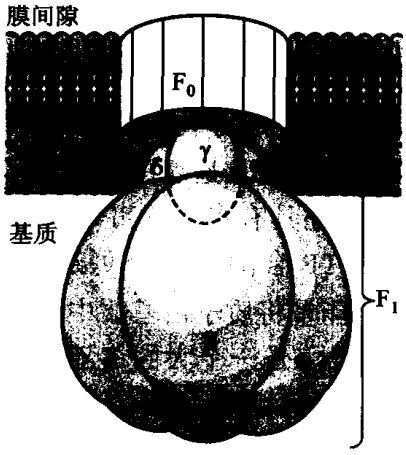


图 5－10　F_0F_1 ATPase 图解（引自 B. Alberts, 1998）

它嵌入疏水性的线粒体内膜，是膜上固有部分。它具有质子载体的作用，能传送质子到达 F_1 的催化部位。实验表明，当纯化的 F_0 掺入至人工膜时，它能给膜提供质子通过的可能性。F_0 亚基组成比较复杂，至今尚未完全确定。现已鉴定出纯化的牛心线粒体 F_0 含有 10 种以上亚基。对 ATP 合酶的组成结构也存在不同看法，有人认为柄部是由头部 F_1 和膜部 F_0 的一部分共同构成的。

ATP 合酶分布广泛，它不仅存在于动物细胞线粒体，也存在于植物叶绿体和细菌的质膜中。如位于细菌质膜上的 ATP 合酶包含一个亲水的 F_1 和疏水的 F_0，现认为，F_1 也具有 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ 结构，F_0 由 3 种多肽链(a、b、c)组成，构成质子流动的通道。已知细菌 ATP 合酶结构中，F_1 通过 γ、δ 和 ε 与 F_0 结合。综合上述，不难看出，ATP 合酶是氧化磷酸化的关键装置，在线粒体、叶绿体和细菌的能量偶联反应中均起着关键的作用。

实验表明，上述呼吸链各组分和 ATP 合成酶在线粒体内膜上的分布是不对称的。

5.1.3.2 氧化磷酸化作用机制

关于能量转换机理、氧化磷酸化的作用机制，最初在 1953 年由 E. C. Slater 提出“化学偶联学说”，1961 年 P. Mitchell 提出“化学渗透假说”，1964 年 P. D. Boyer 提出“构象假说”。至 20 世纪 70 年代，化学渗透假说在取得大量实验结果证实的基础上，显示出其说服力较强，可以说已成为氧化磷酸化作用中较为流行的一种假说。本节着重讨论化学渗透假说(chemiosmotic hypothesis)和构象假说(conformational hypothesis)。

1. 化学渗透假说

该假说由英国生物化学家 Peter Mitchell 早在 1961 年就已提出，20 世纪 70 年代 Mitchell 和 Moyle 等又作了修改使其进一步完善。化学渗透假说的主要内容是：在呼吸链电子传递过程中，通过线粒体内膜上呼吸链组分间氢与电子的交替传递，使质子(H^+)从内膜内侧向外侧定向转移。由于 H^+ 不能自由通过线粒体内膜，被转移到内膜外侧的 H^+ 不能回到内膜内侧，内膜外侧的 H^+ 浓度遂高于内侧的 H^+ 浓度，故形成跨膜的质子梯度，被称为质子动力势(proton motive force, ΔP)。正是由于这种质子动力势中蕴藏的能量经 ATP 合酶催化，驱动 ADP 与 Pi 形成 ATP(图 5-11)。

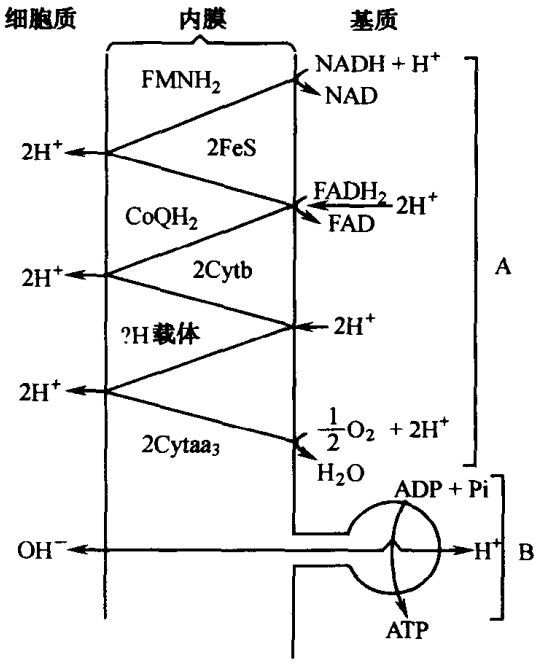


图 5-11 化学渗透假说示意图

A. 伴随电子传递的质子定向从膜内向膜外运送；B. 跨膜质子动力势驱动 ATP 合酶将 ADP 与 Pi 合成 ATP

质子动力势(ΔP)由两部分组成，一是膜内外质子浓度差(ΔpH)，一是膜电位($\Delta\psi$)(图 5-12)，ΔP 以 mV 表示。根据公式：$\Delta P = \Delta\psi - Z\Delta$pH，其中 $Z = 2.303\ RT/F$，公式中 R 为气体常数，T 为绝对温度，F 为法拉底常数。通过公式可计算出一个处于呼吸状态的线粒体的 ΔP(质子动力势)约为 200 mV，其中膜电位约为 140 mV，pH 梯度约为 - 1 pH 单位。

根据 Mitchell 假说，呼吸链在线粒体内膜构成 3 个回路，但对第 3 回路的 H 载体的组分

并不明确(图 5－11),后来,Mitchell 提出 Q 循环,将回路 2 与 3 合并在一起。因此,每个电子通过回路 1 与 Q 循环,分别使 H^+、$2H^+$ 移位。不难看出,根据化学渗透假说,一对电子通过电子传递链上电子载体和氢载体的交替传递,在线粒体内膜上形成 3 次回路,将基质中的 3 对质子定向转移至膜间隙,质子动力势驱动质子通过 ATP 合酶装置进入基质内,每 2 个质子合成一个 ATP 分子。化学渗透假说的最大特点是强调了膜的结构完整性。电子传递释放的能量转换形成膜两侧的质子梯度和电位,如果膜不完整,质子(H^+)能自由出入,则无法形成线粒体内膜两侧的质子动力势,氧化磷酸化就会解偶联。正如前述,一些解偶联试剂的作用在于使膜具有成为对 H^+ 通透的性质,从而使电子传递所释放的能量不能转换合成 ATP。

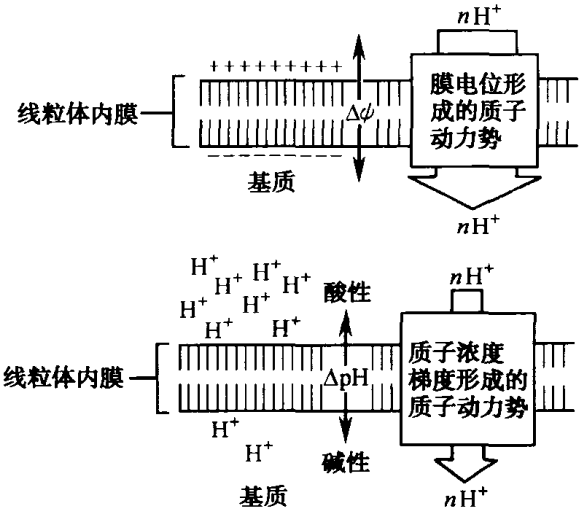


图 5－12　质子动力势组成部分示意图

质子动力势由两部分组成:一个较大的动力势由膜电位组成($\Delta\psi$),一个较小的动力势由质子浓度梯度形成(ΔpH)。这两个动力势均驱使质子进入基质

化学渗透假说得到了大量实验结果的支持,如不仅在线粒体内膜,而且在叶绿体的类囊体膜或细菌质膜的电子传递链进行电子传递过程中,均可形成跨膜的质子梯度。

又如用人工方法使膜内外造成一个质子梯度,它可以通过 ATP 合酶的催化合成 ATP。而一些破坏质子梯度形成的试剂如离子载体抑制剂、解偶联剂等都会破坏氧化磷酸化的进行等。美国 Racker 等的实验是个非常有说服力的证据。他们将嗜盐菌菌紫质(bacteriorhodopsin)——一个光驱动细菌质子泵和牛心线粒体 ATP 合酶共同组装在脂质体内,在光照下菌紫质将光能转换的质子梯度可通过 ATP 合酶合成 ATP(图 5－13)。

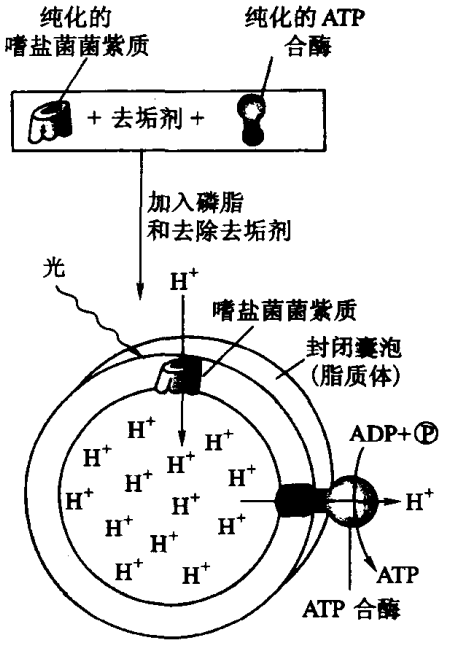


图 5－13　质子梯度驱动 ATP 合酶合成 ATP 示意图

菌紫质和牛心线粒体 ATP 合酶共同组装在脂质体内,经光照由光能产生质子梯度,促使 ATP 合成

由于化学渗透假说被不少实验结果所证实,被人们广为接受。Mitchell 因此获得了 1978 诺贝尔奖。但随着研究工作的深入,得出了与该学说一些矛盾的结果。如根据 Mitchell 假说,将整个呼吸链看作是质子泵,而呼吸链各组分仅是电子(或氢)传递体,但近年来发现呼吸链上的电子传递体如细胞色素氧化酶、NADH－CoQ 还原酶、CoQ－细胞色素 c 还原酶本身都具有质子泵的作用,能将质子泵出膜外。

此外,有实验指出,一些氧化磷酸化抑制剂并不引起 ΔP 或 $\Delta\tilde{\mu}H^+$(质子电化学梯度)数值之变化等。因此化学渗透假说虽被大量实验所支持,但一些内容也还处于争议之中,有待进一步深入研究。

2. 构象假说

该假说以 P.D.Boyer 为代表，他们提出了通过 ATP 合酶合成 ATP 的“结合改变机制”(binding change mechanism)和“旋转模型”(rotational model)。他们认为，与 ATP 合酶活性密切相关的 3 个 β 亚基各自具有一定的构象，构象不同，与核苷酸结合的亲和力也不同。在 ATP 合成过程中，在质子流驱动 γ 和 ε 亚基(与定位的 β 亚基相关)旋转 120°的情况下，3 个 β 亚基的构象也相互发生转变，从而引起了 β 亚基对 ATP、ADP 和 Pi 结合亲和力的改变，导致了 ATP 的合成和释放。具体过程如下：首先 ADP 与 Pi 先与 ATP 合酶 β_2 结合，在较少能量变化情况下，ADP 与 Pi 自发地形成 ATP；在质子流驱动 γ 和 ε 亚基旋转 120°情况下，ATP 合酶 $\alpha_3\beta_3$ 亚基也相对于 γ、ε 亚基发生旋转，同时 3 个 β 亚基发生构象改变，使 β 亚基对 ATP、ADP 和 Pi 的亲和力发生变化，可能一方面增加了 β 亚基对 ADP 与 Pi 的结合和相继发生的 ATP 的合成(图未显示)，另一方面通过降低 β 亚基结合 ATP 的亲和力，导致被结合的 ATP 释放(图 5－14)。鉴于 P.D.Boyer 和 J.E.Walker 在 ATP 合酶催化 ADP 形成 ATP 研究工作方面的贡献，他们荣获了 1997 年诺贝尔化学奖。

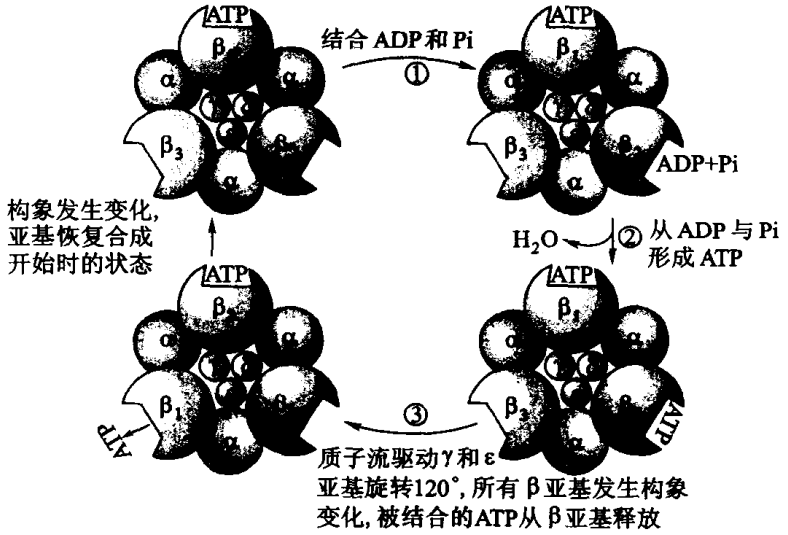


图 5－14 ATP 合酶将 ADP 与 Pi 合成 ATP 的构象假说示意图
(引自 P.D.Boyer, 1989)

在氧化磷酸化作用机制方面，除上述假说外，还有人提出氧化还原酶蛋白与 ATP 合酶之间可以通过侧向扩散、直接作用进行能量传递合成 ATP 等。总之，该领域研究甚为活跃，正向纵深发展。

5.1.4 线粒体是一个半自主性的细胞器

20 世纪 60 年代以前，普遍认为 DNA 只存在于细胞核中。1963 年 M.Nass 和 S.Nass 观察到，在线粒体中一种纤维经 DNA 酶处理后，其纤维结构消失，表明线粒体中含有 DNA。而后在许多动、植物细胞线粒体中均能分离出 DNA。进一步研究发现，在线粒体中还有 mRNA、tRNA、核蛋白体、氨基酸活化酶等。已有资料表明，线粒体是一个含有 DNA 并能进行转录和转译的细胞器。1966 年 Slonimski 等分析了野生型酵母线粒体和呼吸缺陷型酵母线粒体 DNA，首次证明了线粒体 DNA 具有遗传功能。实验表明线粒体 DNA 的变化和线粒体结构与功能变化具相关性。因此，线粒体 DNA 也被认为是真核细胞的第二遗传系统。

5.1.4.1 线粒体 DNA 的结构

线粒体 DNA(简称 mtDNA)较小,结构也较简单。线粒体 DNA 定位在线粒体基质中,有时也附着在线粒体内膜上。除了在一些藻类和原生动物外,线粒体 DNA 一般呈环形,它们与细菌基因组相似,不含有组蛋白。如在哺乳动物细胞中,线粒体基因组一般是一个裸露的共价闭合环状 DNA 分子(图 5-15),其大小为 16 500 碱基对(bp)左右;通常植物细胞中线粒体基因组 DNA 较动物细胞大得多,具体数目依植物种类不同而异(表 5-2)。

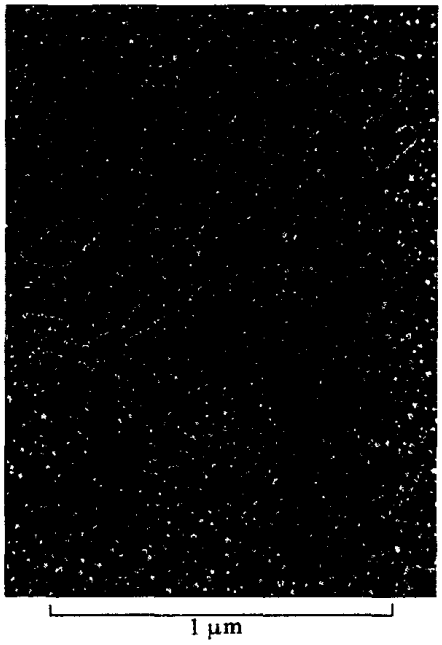


图 5-15 在 DNA 复制过程中动物线粒体 DNA 分子电镜图
两个箭头之间所示是已被复制的环状 DNA 基因(引自 B. Alberts)

表 5-2 线粒体 DNA 的大小与结构

种 类	结构	大小/10^3 bp	注
动物(包含扁虫、昆虫、哺乳类、人)	环形	16～19	
高等植物	环形	150～2 500	
真菌			
裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)	环形	17	在植物中线粒体 DNA 分子大小为几种级别,大小依不同种类而异
曲霉(*Aspergillus nidulans*)	环形	32	
脉孢菌(*Neurospora crassa*)	环形	60	
芽殖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)	环形	78	
衣藻[*Chlamydomonas*(green alga)]	线形	16	
原生动物			
锥虫(*Trypanosoma brucei*)	环形	22	
草履虫属(*Paramecium*)	线形	40	

一个线粒体中含有不同数量的 DNA 分子,在动物细胞中,线粒体 DNA 含量一般仅为全细胞 DNA 含量的 1%左右,但在卵细胞线粒体中 DNA 含量则较多(表 5-3)。

表 5-3 在一些细胞和组织中线粒体 DNA 的相对含量

	组织或细胞类型	每线粒体中 DNA 分子/个	每细胞中含线粒体/个	线粒体 DNA 占细胞 DNA 的比例/%
大鼠	肝脏	5～10	1 000 左右	1
酵母*	生长性的	2～50	1～50	15
蛙	卵	5～10	10^7	99

* 酵母中每个细胞线粒体数目和大小有较大的变化是由于线粒体的融合和分裂(引自 B. Alberts, 等, 1994)

人线粒体 DNA 是一个封闭的双链环状分子。英国 B. G. Barrell 在 20 世纪 80 年代初报道了人线粒体 DNA 全长为 16 569 bp,这是在分子水平上在真核细胞染色体以外被搞清楚基因结构的第一个完整的细胞器遗传单位。人线粒体基因编码的功能也已基本清楚(图 5－16)。实验表明,这些基因在 DNA 分子上排列紧凑,相邻之间没有或只有很少的几个非编码的碱基。在其他一些哺乳动物中,也发现它们与人线粒体具有类似的基因组成与结构。但在低等真核生物如酵母,线粒体基因组结构并不雷同,它全长 78 000 bp,比人线粒体基因组长约 5 倍。在酵母线粒体基因组编码基因间,存在相当数量的非编码区域,它们的功能还不清楚。

线粒体 DNA 以半保留方式进行自我复制,复制时间不局限于 S 期,同时也发现在其他的间期(interphase)时相中。复制时可能附着在线粒体内膜上并以此作为复制起始点。

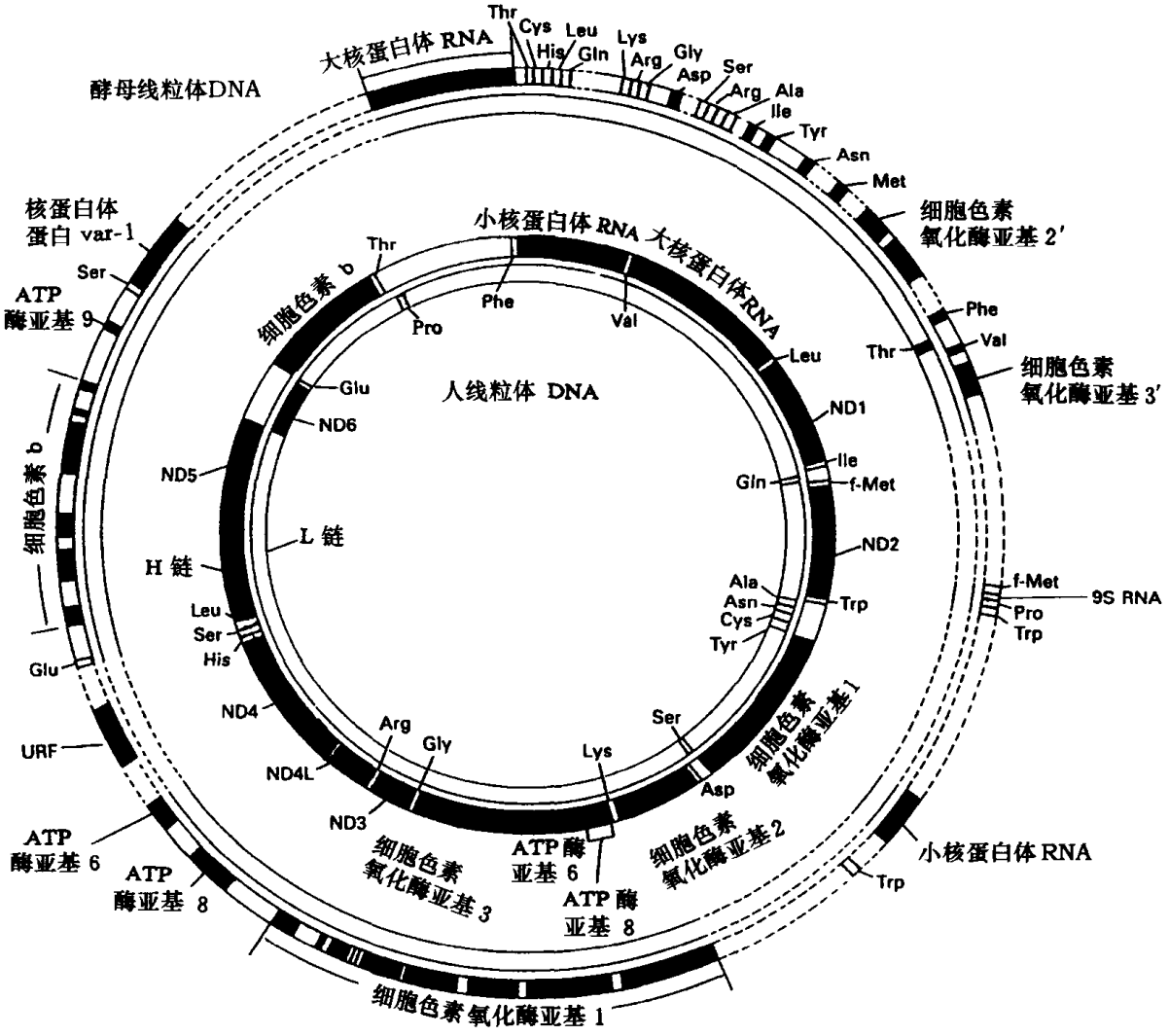


图 5－16 人(内圈)和酵母(外圈)线粒体 DNA 结构图

人线粒体 DNA 序列已全部测出,酵母仅是部分序列,L 链和 H 链分别为 DNA 两条链。结构基因、外显子(exon)和 URF(unidentified of open reading frames)均以深色标出。人线粒体 DNA 编码 NADH－CoQ 还原酶复合物 7 个亚基(ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6),但在酵母线粒体 DNA 中不能编码。酵母细胞色素氧化酶亚基 1、2、3 细胞色素 b 和 21S rRNA 基因包含内含子(intron)。酵母线粒体 DNA 的非编码区大多数功能不清。图中氨基酸均以 3 个字母缩写表示。(此图表示酵母线粒体 DNA 仅比人线粒体 DNA 大 2 倍左右,但实际上大 5 倍)(引自 A. Chomyn, 等, 1986 和 H. Lodish, 等, 1995)

5.1.4.2 线粒体基因组编码的 RNA 和蛋白质

线粒体基因组 DNA 可编码各种 RNA(tRNA、mRNA、rRNA),它们在线粒体核蛋白体中进行蛋白质合成。这些线粒体 RNA 转录体与其转译产物全部保留在线粒体中,为线粒体所特有。实验表明,人线粒体 DNA 可编码 2 种 rRNA(12S、16S)、22 种 tRNA 和 13 种多肽;酵母线粒体基因组 DNA 则可编码 15S、21S rRNA 和 23～25 种 tRNA 及 8 种左右酶蛋白亚基。与细胞核类似,在线粒体中被线粒体 DNA 转录的 RNA 前体也存在广泛的剪切加工过程。如人线粒体 DNA 双链,当在每条链上起始转录后,以大致相同的转录速率分别产生 2 个 RNA 转录本(RNA 前体),每个均包含 DNA 链全长拷贝,因而转录是对称进行的。根据在 CsCl 中密度不同,2 条链分别被命名为重链(即 H 链)和轻链(即 L 链)。在重链上 RNA 前体经核酸酶剪切加工后产生 2 个 rRNA(12S、16S)、大多数 tRNA 和几乎全部编码线粒体蛋白质的含 poly A 的 RNA(只有 NADH 脱氢酶 ND6 亚基为 L 链编码)。轻链(L 链)RNA 前体被剪切加工后产生 8 个 tRNA 和 1 个小的含 poly A 的 RNA,而其余部分包含无用信息,含 poly A 的 RNA 是线粒体 mRNA。与细胞核中合成的 mRNA 不同,哺乳动物线粒体 mRNA 序列中没有内含子并含有最少的非编码序列;但在酵母、一些植物和真菌中,线粒体基因组存在内含子,如酵母线粒体基因组含有较长的富含 AT 的非编码序列,同时至少在基因组的 3 个编码区域含有内含子,这些内含子通过加工剪切除去。

通过线粒体 DNA 转录的 rRNA、tRNA 均通过线粒体核蛋白体用于合成线粒体蛋白质。可能与线粒体起源有关,一般说真核生物线粒体核蛋白体的 RNA 组分和蛋白质的构成、大小及对抗生素敏感性方面均不同于细胞质核蛋白体,但在某些方面却较类似原核生物核蛋白体。又如与细菌类似,线粒体中转录和转译是紧密连在一起的。现已知,由人线粒体 DNA 编码、在线粒体核蛋白体中合成的多肽是细胞色素氧化酶 3 个亚基、ATP 合酶中 F_0 的 2 个亚基、NADH－CoQ 还原酶 7 个亚基和 CoQ－细胞色素 c 还原酶中细胞色素 b 亚基;为酵母线粒体 DNA 编码、由线粒体核蛋白体合成的蛋白质是细胞色素氧化酶 3 个亚基、CoQ－细胞色素 c 还原酶中细胞色素 b 亚基、ATP 合酶 3 个亚基和核蛋白体中的 1 个蛋白(表 5－4)。

表 5－4 不同生物线粒体基因编码的 RNA 和蛋白质

	动 物	酵 母	真菌(脉孢菌)	植 物
rRNAs				
大亚单位	16S	21S	21S	26S
小亚单位	12S	15S	15S	18S
5S RNA	－	－	－	+
tRNAs	22	23～25	23～25	约 30
核蛋白体蛋白(var－1)	－	+	+	?
细胞色素氧化酶 1、2、3 亚基	+	+	+	+
脱辅基细胞色素 b	+	+	+	+
ATP 合酶				
亚基 6	+	+	+	+
亚基 8	+	+	+	+
亚基 9	－	+	－	+
F_1ATP 酶 α 亚基	－	－	－	+
NADH－CoQ 还原酶亚基	7	0	6	6

(引自 V.K. Eckenrode, 等, 1986 和 C.S. Levings, 等, 1989)

线粒体基因组编码的是具有功能的蛋白质，一旦该基因缺失，就会导致相应功能的缺陷，如通过呼吸缺陷酵母突变株实验表明，该突变株发生呼吸缺陷是由于其基因组中缺失编码一些合成其呼吸系统中的基本多肽所必需酶的基因片段所造成。

不难看出，在富含多种蛋白质的线粒体中，由线粒体 DNA 编码合成的蛋白质很少，因此线粒体基因组 DNA 信息是有限的。线粒体中的大多数蛋白质是由细胞核基因编码、在细胞质核蛋白体中合成的。因此，线粒体基因在转录与转译过程中受到核基因的控制，对核基因表现出很大的依赖性，但也表明线粒体具有自身的基因组并能进行转录与转译。因此，线粒体是一个半自主性的细胞器。

5.1.4.3 细胞质中合成的线粒体蛋白质跨膜分选转运至线粒体不同部位

已知在细胞质核蛋白体中合成的线粒体蛋白质运送至线粒体时，大多数以前体(precursor)形式存在，这种前体是由“成熟”形式的蛋白质和氨基末端引伸出的一段导肽或引肽(leader peptide, targetting peptide)共同组成，这种前体的导肽常存在于定位在膜间隙、内膜和基质的部分蛋白质中(如细胞色素氧化酶、细胞色素 c_1、ATP 合酶亚基等)。导肽约为 20～80 个氨基酸残基，带有正电荷的碱性氨基酸含量较为丰富，不含有或基本上不含有带负电荷的酸性氨基酸。它们既有亲水性又有疏水性的 α 螺旋结构的构型也有利于蛋白质穿越线粒体双层膜。导肽对线粒体蛋白质的识别和跨膜运送起着关键作用。导肽内含识别线粒体的信息，它不仅能引导线粒体蛋白质进入线粒体，而且还含有指导蛋白质进入到线粒体特定部位的信息。进一步分析表明，导肽中不同片段分别含有不同的导向信息，它可将不同的线粒体蛋白质分别选送至线粒体的不同部位，如基质、内膜或膜间隙等。

在细胞质中线粒体蛋白质被合成后输送入线粒体基质中，这是一个多步骤由多种蛋白质参与且需能量的过程。如当带有导向基质信息序列导肽的线粒体蛋白质前体跨膜运送时，首先与线粒体外膜上受体结合，如受体 MOM 19 和 MOM 72(相对分子质量分别为 1.9×10^4和 7.2×10^4)可分别与某一类的线粒体蛋白质导肽结合。蛋白质前体与受体结合后，通过线粒体内外膜之间的接触点(membrane contact site)，由质子动力势提供的能量跨越内膜进行运送。在此过程中，尚需要一系列有关的外膜和内膜蛋白参与，如外膜上的蛋白 MOM 22 和输入位点蛋白 ISP 42 等和内膜上 MIM 17 和 MIM 23(相对分子质量分别为 1.7×10^4和 2.3×10^4)等。当蛋白质前体通过内膜被运送至基质中后，导肽在基质中的线粒体导肽水解酶(mitochondrial processing peptidase, MPP)的作用下被切除。

实验表明，线粒体蛋白质前体在跨膜运送之前是需要从折叠状态转变为解折叠状态(unfolding)，形成松散结构，利于跨膜运送；当跨膜后，解折叠状态需要进行重新折叠(refolding)为成熟的蛋白质分子。已有研究表明，蛋白质跨膜运送在解折叠和重新折叠过程中都需要一类称为“分子伴娘”的分子参与。已知“分子伴娘”很大部分属于热休克蛋白(HSP)，该类蛋白质相对分子质量一般在 6.0×10^4以上，常见的有 HSP 70(相对分子质量为 7.0×10^4)和 HSP 60(相对分子质量为 6.0×10^4)等。已有研究表明，“分子伴娘”可能具有解折叠酶(unfoldase)的作用，并能识别解折叠后的蛋白质暴露出的疏水面并与之结合，防止其聚集或折叠。如有人认为带有导向基质信息序列导肽的蛋白质前体进入线粒体时，首先与细胞质中的 HSP 70 结合，保持前体处于解折叠状态，通过与外膜上受体结合(见前述)进入线粒体后，存在于基质中的 HSP 70 与之结合，然后被释放，通过这种结合与释放的相继变化能促使解折叠的插入蛋白质不断地跨膜进入线粒体的基质中(图 5－17)。除上述作用

外,“分子伴娘”还能利用 ATP 水解释放的能量参与蛋白质跨膜运送后分子的重折叠及组装(assembly)过程。如存在于基质中的 HSP 60 不仅可附着于解折叠蛋白质的肽链上促进其折叠(图 5－17),而且也参与了 ATP 合酶 F_1 的 β 亚单位跨越线粒体膜后与其他亚单位的组装作用等。必须指出的是,上述过程均需要 ATP 水解以提供能量,因此在能量转换抑制剂的作用下不能完成其跨膜运送过程。

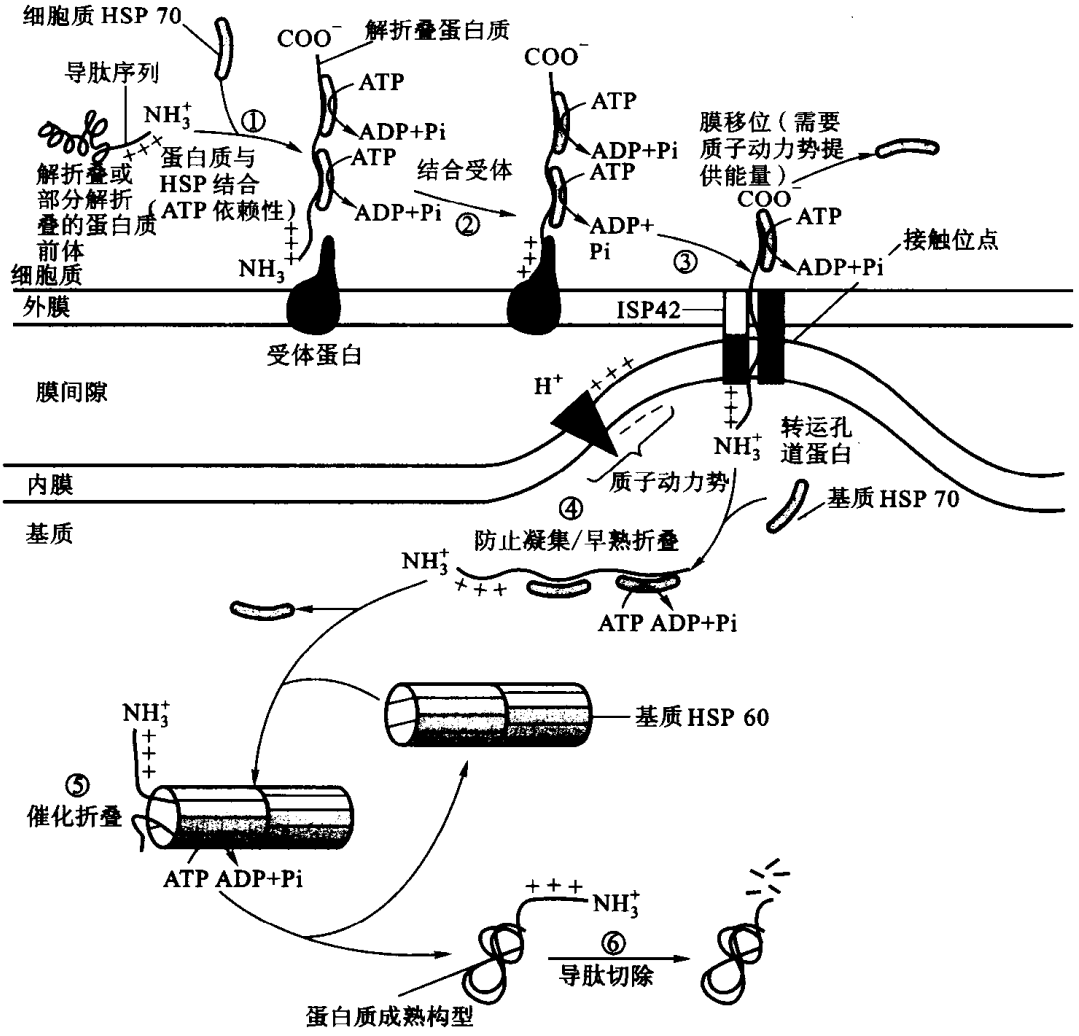


图 5－17　蛋白质进入线粒体基质的主要过程与步骤示意图

①带有导向基质信息序列导肽的蛋白质前体与细胞质中“分子伴娘”热体克蛋白 HSP 70 结合,保持前体处于解折叠状态(ATP 依赖性);②蛋白质前体——“分子伴娘”复合物与外膜上受体结合;③蛋白质前体移位,横跨内外膜之间的接触点进入线粒体(需质子动力势提供能量);④输入的蛋白质前体与基质中 HSP 70 结合,帮助蛋白质输入基质并防止凝集或折叠(ATP 依赖性);⑤从 HSP 70 释放后,蛋白质前体与“分子伴娘”HSP 60 结合,蛋白质前体折叠组装至最终的活化构型(ATP 依赖性);⑥导肽被导肽水解酶切除,成熟的蛋白质保留在基质中(引自 K. Baker, 等, 1991 和 N. Pfanner, 等, 1992)

线粒体蛋白质在细胞质中合成后不仅可被运送至线粒体基质中,而且可被分选运送至内膜或膜间隙中(图 5－18)。如定位在膜间隙的细胞色素 b_2 和细胞色素 c_1,其导肽的肽段含有导向基质与膜间隙信息的不同导向信息,这些蛋白质在运送过程中要经历多个信号和

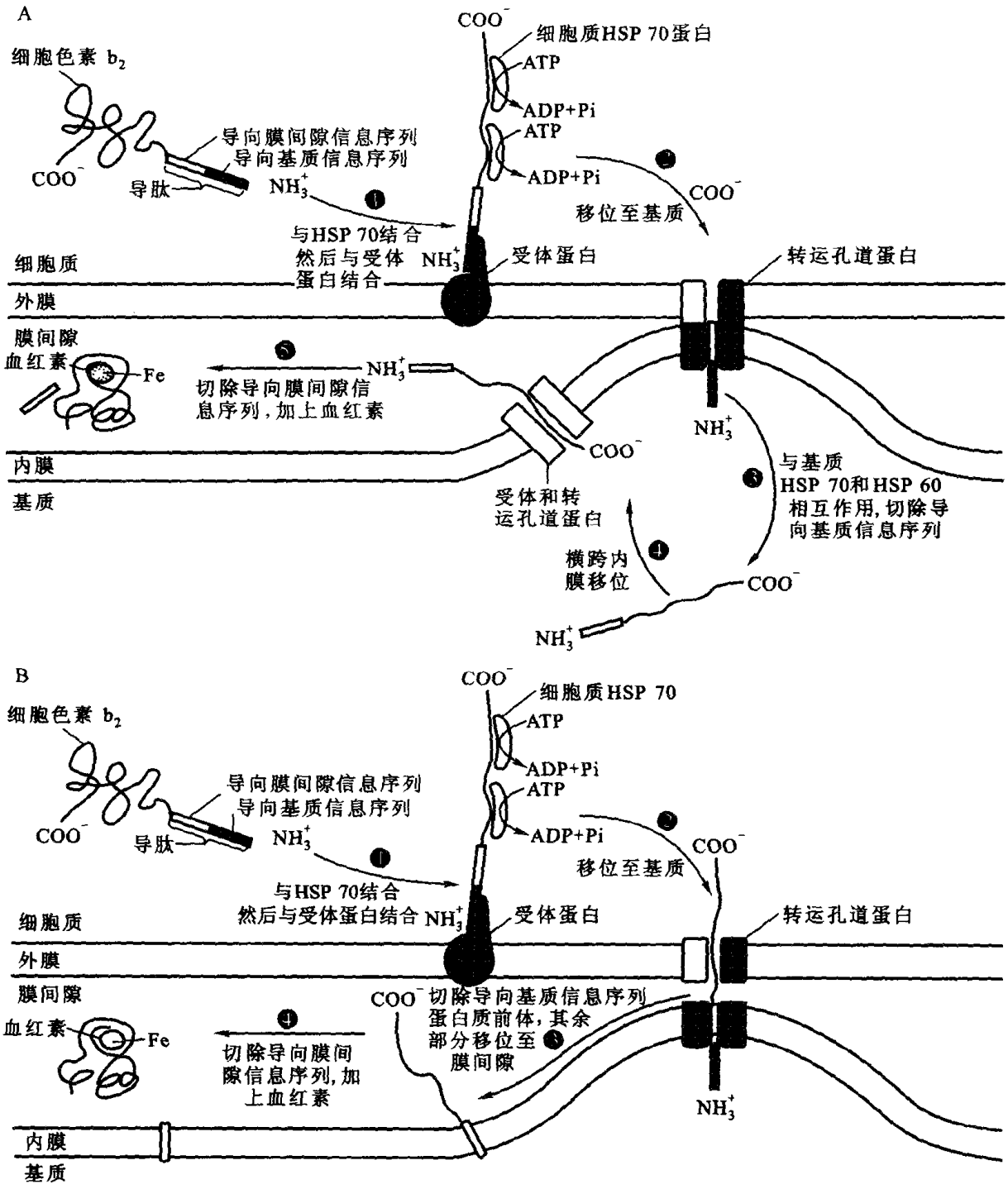


图 5－18 蛋白质从细胞质转运至线粒体膜间隙示意图

A.“保守分选机制”模型。步骤①②，带有导向基质和膜间隙信息序列导肽的细胞色素 b_2 通过导向基质信息序列使蛋白质前体进入基质中；步骤③，该导向序列被切除，该蛋白质前体与基质中 HSP 70 结合，保持解折叠状态；步骤④，含有导向膜间隙信息序列导肽，可能与内膜基质侧受体结合并通过孔道移位横跨内膜，进入膜间隙内；步骤⑤，在膜间隙该导肽被切除并加上血红素，细胞色素 b_2 折叠为成熟型；B.“非保守分选机制”模型，步骤①②基本上与 A 相同；步骤③，导向基质信息序列被切除，而另一个导向膜间隙信息序列却作为一个停止转运序列锚定在内膜中，而该蛋白质前体其余部分移动至膜间隙；步骤④，在膜间隙中，导向膜间隙信息序列被酶切除并加上血红素，细胞色素 b_2 折叠为成熟构型

几种途径，其导肽也需进行两次切除。如根据“保守分选机制”(conservative sorting mechanism)模型，这些蛋白质(如细胞色素 b_2)前体的导肽同时具有导向基质和导向膜间隙信息序列，故细胞色素 b_2 首先通过内外膜接触点进入线粒体基质中，该导向基质信息序列在基质中被蛋白酶切除，而蛋白质前体则通过与 HSP 70 结合保留解折叠状态，而后含有导向膜间隙信息序列导肽的蛋白质前体可能通过与内膜基质侧的受体结合，并通过由内膜蛋白形成的孔道移位横跨内膜进入膜间隙内。在膜间隙该导肽被酶切除，并且加上血红素使细胞色素 b_2 折叠为成熟构型(图 5－18A)。在另一“非保守分选机制”(non conservative sorting mechanism)的模型中，带有导向基质与膜间隙信息序列导肽的细胞色素 b_2 前体，通过内外膜接触点进入线粒体后，通过酶切除其导向基质信息序列，而另一个含导向膜间隙信息序列片段却作为一个停止转运序列锚定在内膜中，阻止了蛋白质前体移位通过内膜，而该蛋白质前体其余部分移位至膜间隙，最后在膜间隙中酶切除导向膜间隙信息序列并加上血红素，进一步折叠为成熟构型(图 5－18B)。

其他转运至内膜的蛋白质，也含有两部分导向信息的导肽，运送过程中也需经过多个步骤后进入内膜中成为内膜蛋白。必须指出的是，并不是所有在细胞质中合成的线粒体蛋白质被运送至线粒体都必须经过上述步骤，如在细胞质中以脱辅基细胞色素 c 形式存在的细胞色素 c，它不含有导肽，当它通过线粒体时，可直接扩散通过线粒体外膜输送至膜间隙，在细胞色素 c－血红素裂合酶催化下加上血红素后定位于内膜外侧。关于定位在外膜上的蛋白质，一般不含有导肽，可能其 N 端的氨基酸序列具有导肽的功能，从而使蛋白质可直接定位于外膜上。综合上述，线粒体功能的维持是核基因和线粒体两套遗传系统密切配合和协调的结果(图 5－19)。

5.1.5 线粒体的增殖

实验表明，线粒体是通过已有线粒体的生长与分裂进行繁殖的。David Luck 将链孢霉培养在含有^{3}H－胆碱(膜磷脂的前身物)培养基中，使线粒体膜被同位素标记，然后再将其转移至没有同位素标记物的培养基中，发现在以后生长的几代线粒体上都出现有放射性的标记。该实验说明了线粒体是从原先存在的线粒体经过生长与分裂而来的。

通过电镜观察发现，一些线粒体的增殖是以间壁分离的方式，即分裂时先由内膜向中心皱褶，中间产生隔膜，将线粒体分为两个，如鼠肝(图 5－20)和植物分生组织中的线粒体。蕨类和酵母等的线粒体分裂时通过线粒体中部缢缩并向两端不断拉长，然后再分裂为两个。也有一些线粒体先从线粒体上出现小芽，然后与母体分离不断长大而形成新线粒体，如在藓类植物和酵母等。

5.1.6 线粒体与疾病

近十多年来对线粒体功能的异常与疾病、衰老等的研究愈益受到人们的重视。特别是随着线粒体遗传研究的进展，对线粒体疾病发生的分子机理也有了较深入的阐明，现已知不少线粒体疾病是由于线粒体 DNA 突变与功能缺陷所致。资料表明线粒体 DNA 的突变率比核 DNA 大 10～20 倍。自 1997 年以来，已知由人类线粒体疾病引起的遗传疾病已达百种以上。一般说，线粒体疾病常包含在一些高能量需求的组织中，如心脏、肌肉和中枢神经系统等。如一种被称为肌阵挛羊痫风和参差不齐红纤维病(myoclonic epilepsy and ragged－red

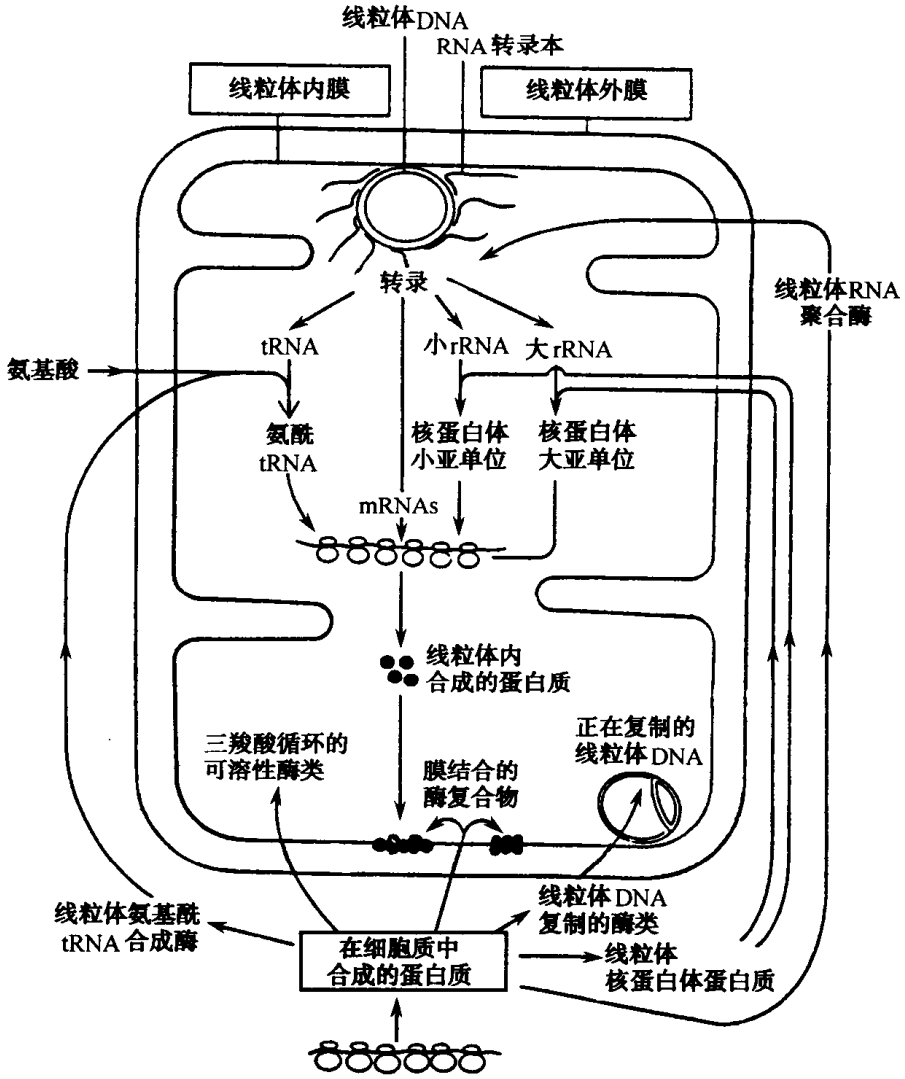


图 5－19 线粒体 DNA 转录和转译与细胞核 DNA 编码蛋白质关系示意图

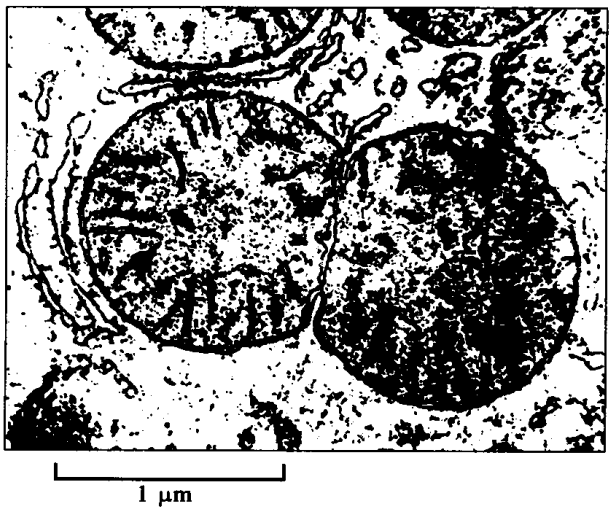


图 5－20 肝细胞中处于分裂状态的线粒体电镜图

(引自 D. S. Friend)

fiber disease, MERRF), 该疾病不少是与线粒体氧化磷酸化作用中酶蛋白缺陷有关; 又如遗传性视神经病(Leber's hereditary optic neuropathy, LHON), 该疾病的分子机理与线粒体 ND6 基因(编码 NADH 脱氢酶的一个亚基)上发生了错义突变(missense mutation)有关; 在一种地方性心肌病(克山病), 患者心肌线粒体明显损伤, 嵴少且不完整, 一些与氧化磷酸化密切有关的酶活性明显降低等。

线粒体与衰老也密切有关。有人认为, 线粒体 DNA 的大片段丢失, 导致能量代谢功能普遍下降, 是构成人类衰老疾病的一个重要因素。线粒体 DNA 重排突变随年龄之增长而被积累。近年来实验进一步指出氧自由基引发线粒体 DNA 的突变也是衰老的一个因素(见第 11 章"细胞的衰老与死亡")。

近年来的实验表明, 线粒体的功能与细胞凋亡密切相关, 如在线粒体内膜包含不少细胞凋亡促进因子(如细胞色素 c 等)。已知细胞色素 c 通过活化与凋亡相关的酶类如 caspases 等导致细胞凋亡; 同时, 细胞凋亡抑制因子 Bcl-2 也主要定位在线粒体外膜、核膜和内质网膜上。近年来实验表明, 位于线粒体外膜上的 Bcl-2 可阻止细胞色素 c 向胞质释放, 这可能是其抑制凋亡的分子机理之一(见第 11 章细胞的衰老与死亡)。

5.2 叶绿体

所有生活细胞所需的全部有机物, 追其源是由光合作用产生的, 而光合作用只能发生在具有叶绿素的植物和一些有光合能力的细菌中。植物的光合作用是在特殊细胞器——叶绿体中进行, 叶绿体能完成这种独特的功能是与其结构分不开的。

5.2.1 叶绿体的结构

叶绿体在细胞内的数目、大小和形状因植物种类不同而有很大差别, 特别是在藻类变化更大。大多数高等植物的叶细胞一般含有 50～200 个叶绿体, 可占细胞质体积的 40%～90%。典型的叶绿体形状为透镜形, 它们的长轴约为 4～10 μm, 短轴为 2～4 μm。叶绿体大约比线粒体大 2～4 倍。通过对叶绿体超薄切片的电镜观察, 可以揭示其微细结构(图 5-21), 一个典型的叶绿体是由叶绿体外被、层膜系统和基质组成。

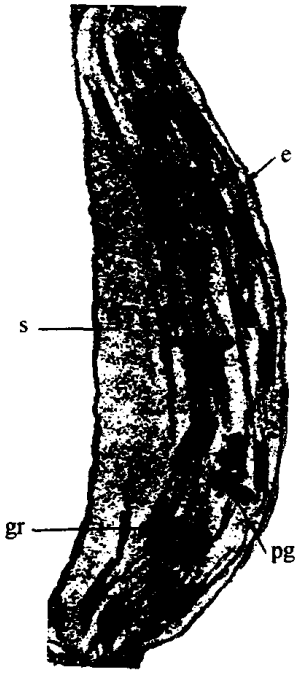


图 5-21 滨海碱蓬(*Suaeda maritima*)叶绿体的电镜照片
e: 叶绿体外被; gr: 基粒; s: 基质; pg: 质体小球(引自 J. L. Hall)

5.2.1.1 叶绿体外被

叶绿体具有一高度透性的外膜和透性很低的内膜, 即内膜对物质透过的选择性比外膜强, 是细胞质和叶绿体基质间的功能屏障。CO_2、O_2、Pi、磷酸甘油酸、丙糖磷酸、双羧酸和双

羧酸氨基酸等可透过内膜，在内膜上埋藏着特殊载体——转运体(translocator)，可以转运这些代谢物。例如，Pi 转运体可以转运 Pi、磷酸甘油酸、丙糖磷酸等。两膜之间有一狭窄的间隙(约 10～20 nm)并与内、外膜一起形成叶绿体外被(chloroplast envelope)。

5.2.1.2 类囊体

在叶绿体内部结构上，最突出的特征是具有复杂的层膜系统，在电镜下观察其基本构造都是由双层膜组成的，类似扁平的囊，中间为空腔(其内并不是空的)，所以称为类囊体(thylakoid)。它们沿叶绿体长轴平行排列，但在一定区域排列紧密，类似一摞硬币，称为基粒(grana)(图 5－22)。基粒中的类囊体称为基粒类囊体，基粒之间的类囊体称为基质类囊体。

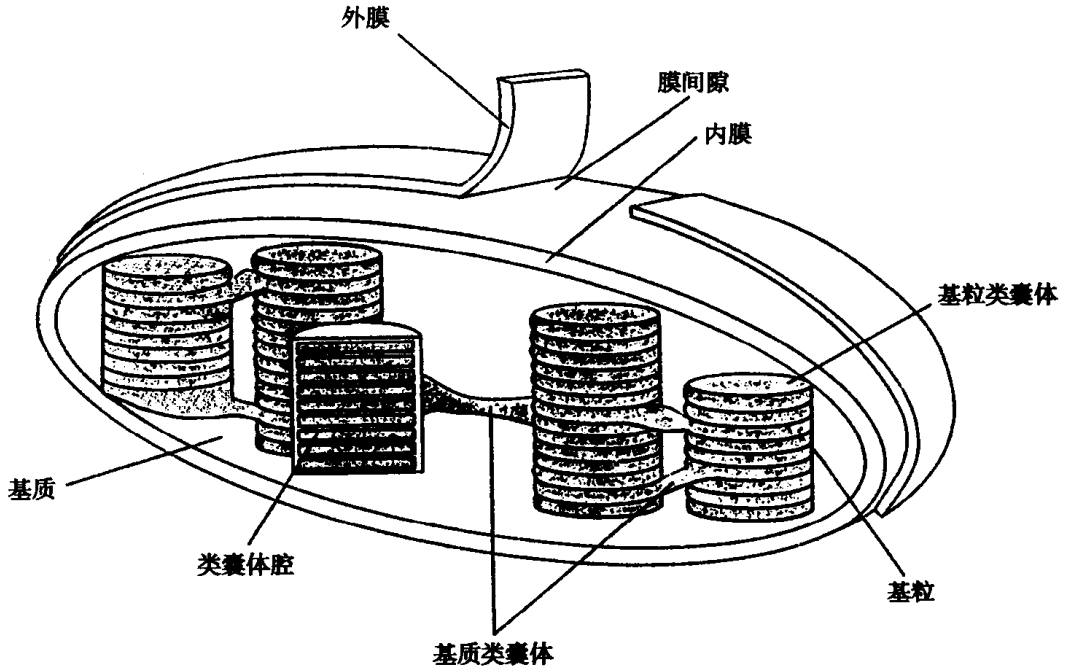


图 5－22 叶绿体结构的图解

叶绿体的一个单独超薄切片展示的类囊体均为封闭的囊及不连续的膜系统片段。通过对一系列连续切片的重组可以描绘出类囊体复杂的三维结构。现在广为接受的看法，认为整个内部的网状膜系统是由一张连续的层膜所构成，层膜在一定区域折叠形成基粒。这个膜系统包围着一个连续的空间即类囊体腔，并使腔与叶绿体基质隔开。类囊体一词的原始概念是表示每一个片层是一个封闭的囊，现在已经失去了它原始的意思。虽然如此，仍保留类囊体一词来形容在电镜下超薄切片所显示的叶绿体内部的膜结构。

光合作用过程中光能转变为化学能是在类囊体膜上进行，因此对其超微结构的研究一直受到重视。

类囊体膜的超微结构：利用冰冻断裂蚀刻技术，可以将生物膜沿其疏水区断裂，膜被分成两半而暴露出其内部结构，复制成像即可进行研究，各小面的专门术语见图 5－23。图 5－24 为豌豆类囊体膜各断裂面的图像，显示各断裂面上的颗粒在形状、大小及数量上均不相同。类囊体膜上具有全部由光能转化为化学能所需要的功能组分。这些组分分别组装在

至少是 5 种膜蛋白复合物中。类囊体表面及断裂面上的颗粒就是这些膜蛋白复合物的形态等同物。这 5 种复合物分别叙述如下：

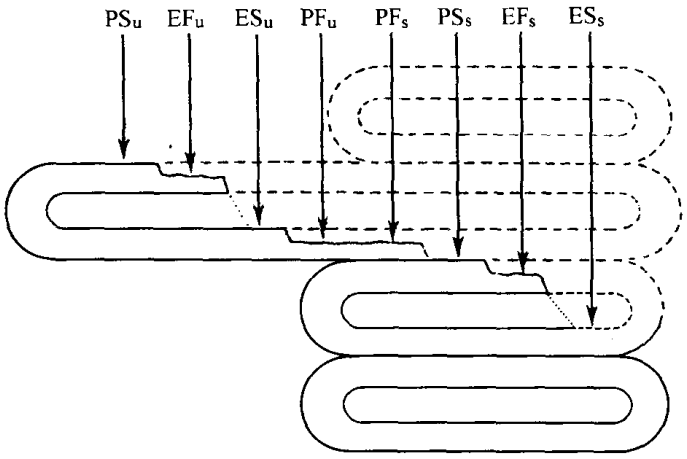


图 5－23　示类囊体膜的表面及断裂面的图解

当生物膜沿其疏水区被断裂后，靠原生质的小面称为原生质小面，以 P 表示，对类囊体来说是靠叶绿体基质的小面为原生质小面；靠细胞外部的小面称为外质小面，以 E 表示，对类囊体来说紧靠其腔的小面为 E 面。以 F 和 S 分别标示断裂面和自然表面，又由于基粒类囊体和基质类囊体在 P 及 E 面的结构不尽相同，所以在小面符号的下角，以 s 和 u 分别表示摞叠及非摞叠区域。因此，类囊体膜可分为 8 个面即 PS_s、PF_s、EF_s、ES_s、PS_u、PF_u、ES_u 和 EF_u（引自 R. P. F. Gregorg）

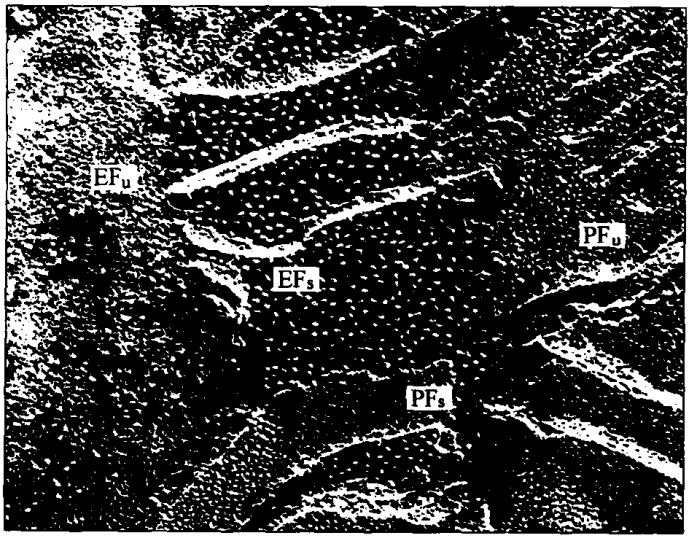


图 5－24　冰冻断裂的豌豆类囊体显示 4 种断裂面
（引自 L. A. Staehelin，等）

PSⅡ复合物（photosystem Ⅱ complex）组成的膜内颗粒分布在 EF_s 及 EF_u 上，该复合物是由核心复合物（core complex）包括作用中心、水裂解系统及 CP_{43} 和 CP_{47} 捕光天线色素等和围绕核心复合物的结合态 chla/b 捕光复合物单位组成。由于捕光色素复合物数目的不同，可使 EF_s 颗粒的变化幅度为 10～18 nm（PSⅡ核心复合物的直径为 8 nm）。在 EF_u 上的颗粒大小比较一致，平均直径约 10.5 nm。正常生长的植物 PSⅡ复合物在 EF_s 及 EF_u 的分布分别为 80%～85% 和 15%～20%。

PSⅠ复合物（photosystem Ⅰ complex）主要位于 PF_u，其直径为 7～8 nm，由于围绕它的结合态捕光色素复合体数目的不同而使它所组成的 PF_u 颗粒变化范围在 10～13 nm。

细胞色素 bf 复合物（cytochrome bf complex）是位于 PF 的颗粒，其大小可能是8～9 nm，该复合物与 PSⅡ复合物在类囊体膜上的比率约为 1∶1，细胞色素 bf 复合物在 PF_s 与 PF_u 的

数量大致相等。

CF_0-CF_1ATP 合酶(CF_0-CF_1 ATP synthase)中,CF_1 亚单位以直径为 10～12 nm 颗粒仅存在 PS_u 及基粒的末端膜上,CF_0 亚单位以 9～10 nm 直径的颗粒存在于与 CF_1 相应的断裂面上。

chla/b 捕光复合物(chla/b light-harvesting complex)的作用是吸收光能及传递光能到作用中心。它与 PSⅡ核心复合物紧密结合形成 EF 上的颗粒。经研究又发现,在 EF 上存在有不与 PSⅡ核心复合物紧密结合的 chla/b 捕光复合物,其直径约为 8 nm。当光输入 PSⅡ多时,这种颗粒就发生磷酸化作用并从基粒类囊体 PSⅡ处横向移到基质类囊体 PSⅠ处,当去磷酸化则移向 PSⅡ,以调节光能在 PSⅡ与 PSⅠ之间的均匀分配。因此称其为可移动的 chla/b 捕光复合物。

此外,还发现类囊体的摞叠是处于不断变化之中,即摞叠是动态的,它们可以可逆地反复发生摞叠或非摞叠。如上所述,类囊体膜内有些组分也是可以移动的,所以,认为类囊体膜的结构为静态的概念是不全面的。

5.2.1.3 叶绿体基质

叶绿体内膜之内的无定形物质称为基质(stroma),片层系统即悬浮在其中。基质主要成分为可溶性蛋白质,其中含有许多代谢酶,以 RuBP 羧化酶占其中大部分。基质中含有叶绿体本身的基因组和遗传系统,所以在基质中含有一套特有的核糖体、RNA 和 DNA,这样使得叶绿体在遗传上具有一定的自主性。此外,基质中还含有淀粉粒、质体小球及植物铁蛋白(存在于幼年正在分化的质体中)。

5.2.2 叶绿体的主要功能——光合作用

绿色植物利用体内叶绿素吸收日光能,把 CO_2 和水转化成有机物,并释放氧气的过程称为光合作用(photosynthesis)。它的全部化学反应可概括如下:

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow[\text{叶绿素}]{\text{光}} [CH_2O] + O_2$$

通过光合作用使 CO_2 还原为富含能量的糖类,总的过程必须有光能的参与,所以光合作用的本质是光能转换为化学能的过程。光合作用过程包括许多不同的反应,可以将它们归属于两类范畴,即光反应及暗反应。

光反应(light reaction)的内容是将吸收的光能转变为不稳定的化学能,暂时贮于 ATP 及 NADPH 中。可将光反应的内容归纳为 3 个过程,即原初反应、电子传递及光合磷酸化过程。所有光反应的成分均存在于类囊体膜上,因此,光反应是在类囊体膜上进行。

暗反应(dark reaction)的内容是利用光反应产生的 ATP 及 NADPH 作为能源及还原剂将 CO_2 转化为糖,使能量转变为稳定的化学键能。CO_2 不断被还原形成糖所经历的途径称为卡尔文－本森(Calvin－Benson)循环。该过程之所以被称为暗反应是因为它们需要光反应产生的 ATP 及 NADPH,而与光无直接关系。但是,研究者在 20 世纪 80 年代初即确定该循环中的某些酶的活性是受光调节的。

5.2.2.1 原初反应

原初反应(primary reaction)是指叶绿素分子被光激发到引起原初光化学反应为止的过

程,或是指光能被聚光色素吸收并传递到作用中心,发生正负离子形成(即电荷分离)的过程。该过程仅在小于或等于 10^{-9} s 内完成,是一个非常快速的过程。现已公认在光反应中包括两个原初光化学反应,并分别由两个光系统完成。

光系统从结构上看是由很多分子聚集在一起并结合得比较牢固的复合物,它是由核心复合物和捕光色素复合物组成,前者包含有作用中心(reaction centre)。根据现在资料认为,高等植物的 PSⅠ复合物由约 14 个不同的多肽亚单位组成(图 5-25)。图 5-26 为 PSⅡ核心复合物的亚单位组分模型,它是由约 15 个横跨膜的多肽链及 3 个外部多肽链(即 psb Q、psb P 及 psb O)组成。

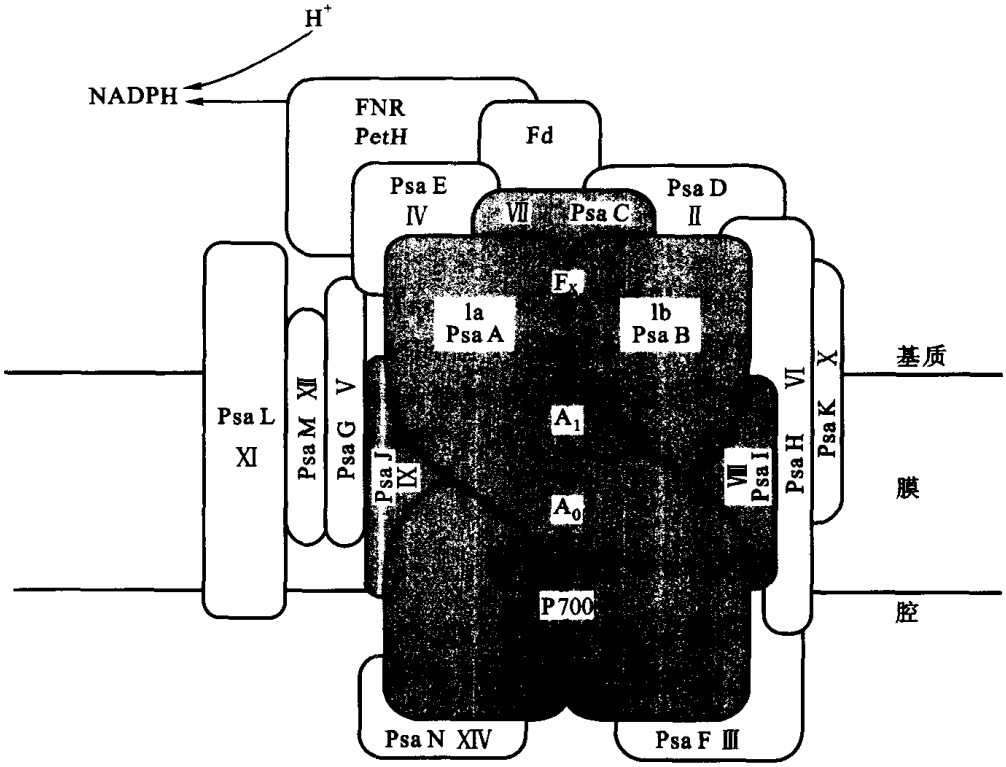


图 5-25 PSⅠ核心复合物的亚单位结构模型

1a、1b、Ⅱ~XIV 或 Psa A 或 Psa N 示不同多肽链名称,1a 和 1b 形成了能发生电荷分离的最小复合物即作用中心,其上结合有 P 700、A_0、A_1 和 F_x。暗区示该多肽链是由叶绿体基因编码,白色区示由核基因编码。箭头表示电子传递途径(仿自 R. Herrmann, 等)

作用中心是能引起原初光化学反应或电荷分离并使电荷分离稳定的一个最小单位,其上结合有原初电子供体(D)和原初电子受体(A),及一些次级电子受体和供体。原初电子供体是处于特殊状态的叶绿素 a,目前对它了解的还不够清楚,是以它的最大吸收高峰的波长作为标志,如 P 700 或 P 680,P 代表色素,700 及 680 表示该色素最大吸收高峰的波长(nm)。在光系统中具有 P 700 者称为 PSⅠ,具有 P 680 称为 PSⅡ。叶绿素 b 及绝大多数叶绿素 a 只起吸收和传递光能的作用,不参加光化学作用,故称为聚光色素或天线色素。P 700和 P 680 可以发生光化学反应。

原初反应的第一步是聚光色素吸收光量子后呈激发态,随后是在聚光色素间发生激发的共振传递,并最后传递到作用中心色素。在 PSⅡ最终传递到 P 680,在 PSⅠ最终传递到

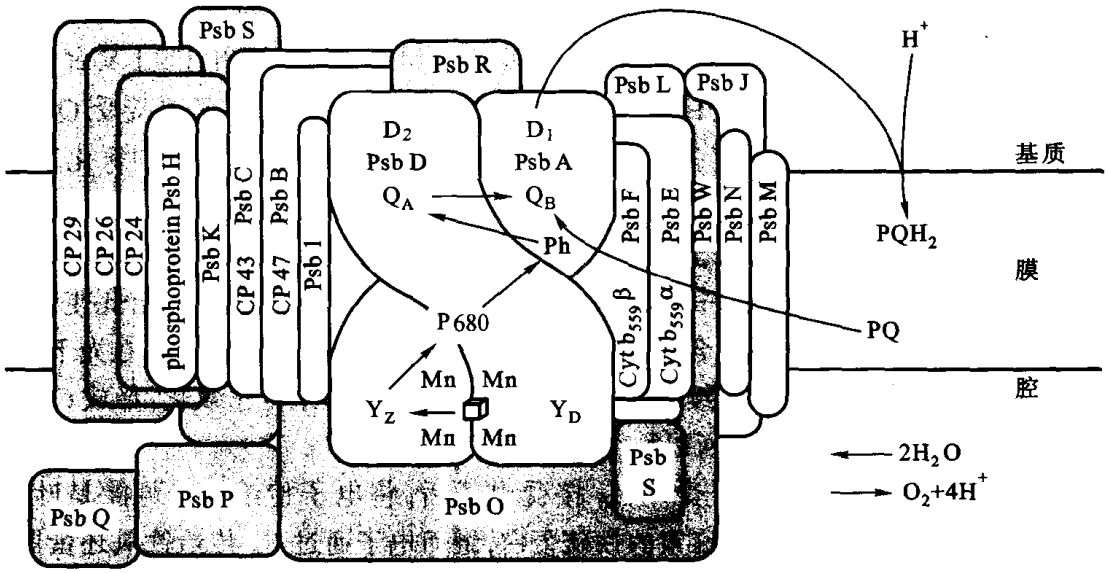


图 5-26 PSⅡ核心复合物的亚单位组分模型

亚单位 D_1 和 D_2 为作用中心，其上结合有 P 680、Ph、Q_A、Q_B 及 Mn，Y_Z 和 Y_D 分别表示 D_1 上一个酪氨酸 Z 和 D_2 上一个酪氨酸 D，Psb O、Psb P、Psb Q 为外部蛋白，它们的作用为稳定水的氧化。CP 43 和 CP 49 多肽与叶绿素结合，做为内部天线聚光系统，其他多肽链功能不甚清楚。暗区示该多肽链是由核基因编码，白色区示由叶绿体基因编码，箭头表示电子传递途径(引自 R M. Dey, J. B. Hasboren)

P 700。由于 P 680 及 P 700 处于特殊的微环境中，这个环境可使它们在受到激发后还来不及发生激发传递时，其高能电子就被电子受体所接受，这个受体称为原初电子受体(A)。P 700和 P 680 则称为原初电子供体(D)，也就是 A 与 D 之间发生最初的光化学反应，即电荷分离：$DA \longrightarrow D^*A \longrightarrow D^+A^-$，而将光能转变为化学能。但 A^- 很不稳定，只有通过一系列电子传递及光合磷酸化作用才能形成比较稳定的高能化合物。对 PSⅠ来说 A 为一种特殊状态的 chla，以 A_0 表示，对 PSⅡ来说 A 是去镁叶绿素，即图 5-27 中的 Ph。原初反应可以说是光合作用最核心的问题，因为在该过程中将光能捕获。一旦两个光系统的原初电子受体得到电子，就结束了对光的需要，所以光反应中直接利用光能之处仅在原初反应，NADPH 和 ATP 的形成虽属于光反应，但并不直接需要光。

5.2.2.2 电子传递

通过原初反应，在 PSⅡ形成一个很强的氧化剂 $P\,680^+$ 和一个弱的还原剂 Ph^-，$P\,680^+$ 能从水中夺取电子。相反，在 PSⅠ形成弱的氧化剂 $P\,700^+$ 和强的还原剂 A_0^-，后者可以还原 $NADP^+$。以 PSⅡ通过原初反应形成的还原剂 Ph 还原由 PSⅠ形成的弱氧化剂 $P\,700^+$，这样水中的电子最终给予 $NADP^+$。由此看出，在两个光系统吸收光能引起原初光化学反应后，立刻导致电子流的发生。

目前被普遍承认的电子传递途径是 Z 链(Z-scheme)，它是由一些电子传递体将两个原初反应串联起来，按电子传递体的还原电位顺序所做的图示。图形像横写的英文字母“Z”，由此而得其名，见图 5-27。

Z 链的 PSⅡ一侧，当发生原初反应时，P 680 供出电子给予原初电子受体 Ph，Ph 将电子传给 Q_A，Q_A 是牢固地结合在 D_2 上的 PQ 分子，它仅能传递一个电子，Q_A^- 将电子传给 Q_B。

Q_B 也是 PQ 分子，结合在 D_1 上，它从 Q_A 得到一个电子形成 Q_B^-，Q_B^- 又可从 Q_A^- 再得到第二个电子形成 Q_B^{2-}，随后质子化，被完全还原为 Q_BH_2，于是 Q_BH_2 离开 PSⅡ复合物进入类囊体膜中的 PQ 库，其中的另一个 PQ 分子结合到 D_1 上再次形成 Q_B，又可接受 Q_A^- 传递的电子。Q_BH_2 将电子传递到 Cyt bf 复合物，其后电子通过质体蓝素(PC)传到氧化态 P 700，PC 位于类囊体膜的内表面。

由于 P 680 供出高能电子，而呈现氧化态 $P\,680^+$，因此，伴随发生的是 $P\,680^+$ 从电子供体 Z(目前认为 Z 是 D_1 多肽链的一个酪氨酸残基)得到电子，以恢复原状，由此使 Z 带正电荷，Z 最终从水中得到电子，MnC(含 Mn 的蛋白质复合物)位于水和 Z 之间，在光下由于 Z 4 次从 MnC 得到电子，MnC 可以连续累积 4 个正电荷，而使 2 个水分子氧化，释放 O_2、质子及电子。由于水被氧化是由光引起所以称为水的光解。

在 Z 链的 PS I 侧，原初电子受体 A_0 接受电子后，将电子传给 A_1(可能是叶绿醌即 V_{k_1})，它将电子传给 F_x，其为非血红素的铁硫蛋白，继而电子通过 F_A 传给铁氧还蛋白(Fd)，然后通过 Fd:NADP 氧化还原酶(FNR)传给 $NADP^+$，后者得到电子后，再从介质中结合 H^+，从而使氧化态的辅酶Ⅱ形成还原态的辅酶Ⅱ。所以 $NADP^+$ 是最终电子受体。$P\,700^+$ 从 PC 得到电子而恢复原状，又可再接受由聚光色素传递来的激发能。

总之，由于两个光系统输入了能量，导致形成两个高能电子给予两个受体，而引起水中电子传递到 $NADP^+$，这种电子流是非循环式电子流。在某种情况下，由 P 700 给出的高能

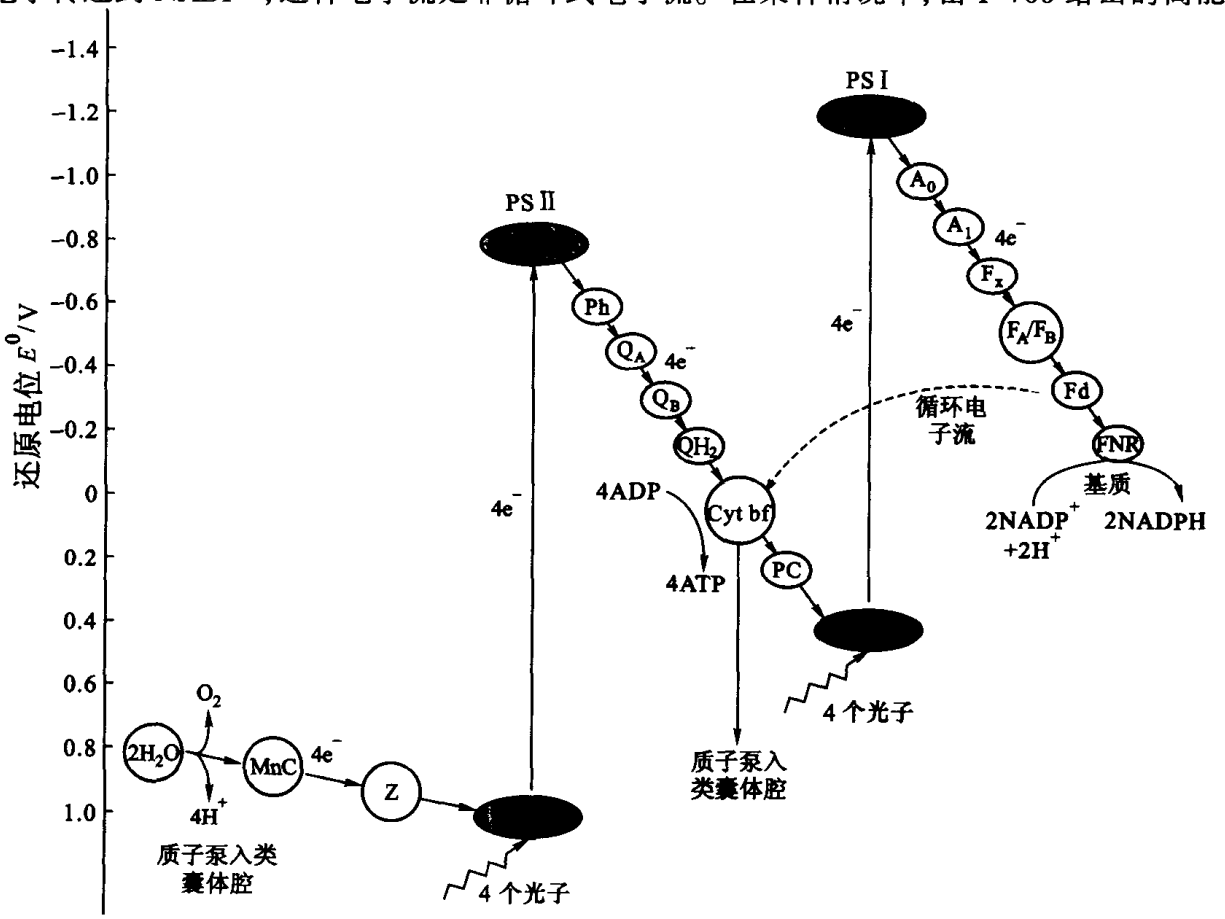


图 5－27 电子传递途径(引自 J. Stenesh, 1998)

电子传到 Fd 后，经 Cyt bf 复合物传到 PC，最后电子又回到 P 700，故这种电子流称为环式电子流。

5.2.2.3 光合磷酸化

在光合电子传递过程中偶联 ATP 的形成，以这种形式合成 ATP 称之为光合磷酸化。在非循环式电子流中偶联磷酸化形成 ATP 称为非循环式光合磷酸化（non-cyclic photophosphorylation），其产物除 ATP 外还有 NADPH 及分子氧的形成；在循环式电子流中偶联磷酸化形成 ATP 称为循环式光合磷酸化（cyclic photophosphorylation），其产物仅有 ATP。当细胞中 $NADPH/NADP^+$ 的比值高，即做为接受由 Fd 传递的电子受体 $NADP^+$ 不足时，各种代谢反应又需要 ATP，在这各情况下，循环式光合磷酸化即发生。因此它可以帮助维持 NADPH 与 ATP 有一个适当的比值。当非循环式光合磷酸化不能提供足够的 ATP 驱使暗反应及其他需 ATP 的反应进行时，循环式光合磷酸化就可以提供所需的 ATP。所以可以看出叶绿体具有一个精致的控制系统以保证维持恰当的 ATP 与 NADPH 的比值。

光合电子传递体组装在 3 个复合物中即 PSⅠ、PSⅡ和 Cyt bf 复合物中，它们之间不需要相互靠近，因为在它们之间有可移动的电子载体——质体醌，为亲脂分子，位于膜的脂双分子层中，类囊体膜脂中的不饱和脂肪酸含量较高，所以膜流动程度高，质体醌特别是还原型的可以在流动的介质中很快地横向扩散。PC 也可以很快的速度沿膜内表面扩散，以使 $P\ 700^+$ 得以还原。PSⅠ和 ATP 合酶主要位于基质类囊体，PSⅡ主要位于基粒类囊体，Cyt bf 复合物则均匀分布在基质及基粒类囊体上。

光合磷酸化的作用机理（以化学渗透学说为例）与氧化磷酸化类似，两者在电子传递和 ATP 形成之间起偶联作用的是在有 ATP 合酶的膜内外之间均存在质子动力势。在光合磷酸化中，合成 ATP 的质子梯度，是在电子传递途径中的两处反应产生 H^+ 而形成的，一处为水的光解，即 $2H_2O \longrightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$；另一处是 Cyt bf 复合物与 QH_2 发生反应，即 $QH_2 + 2(Cyt\ bf)_{ox} \rightleftharpoons Q + 2(Cyt\ bf)_{red} + 2H^+$，使基质中 H^+ 泵入类囊体腔内。结果使腔内 pH 下降，使基质中 pH 上升，由于梯度的存在，质子由类囊体腔内通过结合在膜上的 ATP 合酶移到类囊体膜外，在膜外侧形成高能态的能化状态，通过膜外的 CF_1 发生磷酸化作用，使 ADP 与 Pi 形成 ATP。

5.2.2.4 光合碳同化

光合碳同化是 CO_2 被固定和还原进而形成糖的过程。高等植物的光合碳同化是通过 3 种不同途径来实现的。其中基本的途径是卡尔文－本森循环，它能净固定 CO_2。某些植物除具有基本途径外，还具有 C_4 途径或景天科植物酸代谢途径，它们不能净固定 CO_2，只能是附加或补充系统，达到改善对 CO_2 供应的目的。现仅介绍基本途径。卡尔文和他的同事从 20 世纪 40 年代到 50 年代中期研究了 CO_2 同化的途径。他们以小球藻作为主要研究材料，利用长寿放射性碳（$^{14}CO_2$ 或 $H^{14}CO_3$）饲喂植物。经过不同时间的照光（数秒直至数十分钟）后，迅速将绿藻放进沸酒精中，停止酶活动。利用双向纸层析法将绿藻浸提液中的化合物分开，用放射自显影法鉴定放射性碳存在于哪些化合物中。根据照光的时间长短，可以找出各化合物出现的顺序，并对某些重要化合物用化学方法将其拆开，鉴定各碳原子间放射性分布数量。他们发现，在极短（5 s）照光下，放射性首先并以绝对优势出现在 3－磷酸甘油酸（PGA）的羧基碳上。由此认为 CO_2 同化过程的第 1 步首先是羧化作用。他们对 C_6 糖上各

碳原子的放射性进行测定，发现照光 30 s，在第三加第四碳原子上放射性占的百分数最高。如照光时间延长(60 s)则放射性在 C_6 糖的各碳原子上分布基本相似。根据已知的生化反应，在醛缩酶作用下，2 个 C_3 糖缩合成 C_6 糖，所以在第三、第四碳原子上放射性占比例大，照光时间变长(60 s)放射性在各碳原子上的分布数量接近一致，使他们推想 CO_2 接受体也是由被同化的 CO_2 衍生而来，这样碳的转变途径必然是一个环式结构。通过极短照光后，分别对出现在 C_3、C_4、C_5、C_6 和 C_7 糖中各碳原子间放射性量进行测定，并利用已知生化知识找到它们相互转化的关系，由此得知 C_5 糖由 C_3 糖衍生而来(图 5－28)。最后他们改变光－暗变化，测定 PGA 及核酮糖－1,5－双磷酸(RuBP)含量变化，结果由光转入暗使 PGA 含量上升，RuBP 下降。因为在暗中 ATP 及 NADPH 不能形成，致使 PGA 不能还原形成糖，而羧化作用又不需要能量，所以 PGA 含量上升。假设 CO_2 接受体是由被同化的 CO_2 衍生而来，由于在暗中 PGA 不能被还原成糖，CO_2 接受体不能继续形成，同时又不断进行羧化反应，这样接受体含量必然会下降。当去掉光照时 RuBP 含量下降，因此推测 RuBP 是 CO_2 接受体。

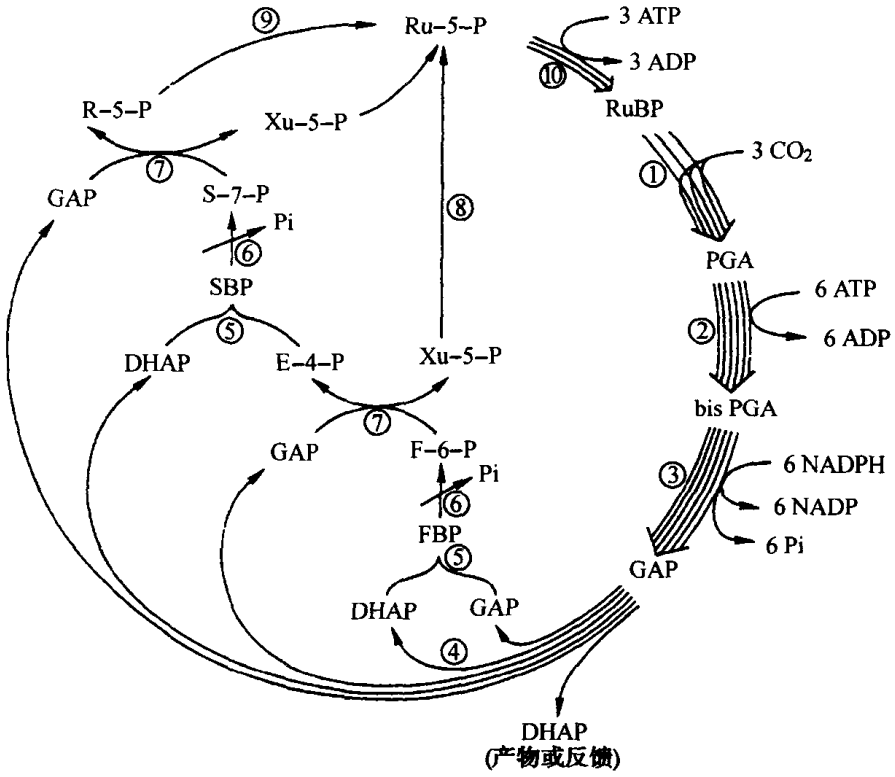


图 5－28　卡尔文－本森循环

3 分子 RuBP 固定 3 分子 CO_2，产生 6 分子 PGA，然后被还原形成 6 分子甘油醛－3－磷酸，其中 1 分子转变为光合产物，其他 5 分子再生 3 分子 RuBP。净结果是同化 3 分子 CO_2，消耗 9 分子 ATP 及 6 分子 NADPH，形成 1 分子甘油醛－3－磷酸，再生原剂量的 RuBP，总之，全部反应是 3 个 CO_2 分子转变为 1 分子 C_3 糖，这是一次循环

DHAP：二羟丙酮磷酸；E－4－P：赤藓糖－4－磷酸；FBP：果糖－1,6－二磷酸；F－6－P：果糖－6－磷酸；GAP：甘油醛－3－磷酸；PGA：甘油酸－3－磷酸；bis PGA：甘油酸－1,3－双磷酸；R－5－P：核糖－5－磷酸；Ru－5－P：核酮糖－5－磷酸；RuBP：核酮糖－1,5－双磷酸；SBP：景天庚酮糖－1,7－双磷酸；S－7－P：景天庚酮糖－7－磷酸；Xu－5－P：木酮糖－5－磷酸。数目字代表相应的酶：①RuBP 羧化酶；②磷酸甘油酸激酶；③甘油醛－3－磷酸脱氢酶；④丙糖磷酸异构酶；⑤醛缩酶；⑥磷酸酶；⑦转酮醇酶；⑧表异构酶；⑨异构酶；⑩磷酸核酮糖激酶

RuBP 与 CO_2 最终形成 C_6 中间体，再转化为 2 个 C_3 化合物即 PGA。当时又在菠菜叶绿体基质中发现 RuBP 羧化酶，这为推测添加了证据。由此卡尔文等提出了 CO_2 同化途径的图式(图 5－28)。

卡尔文－本森循环包括 13 个反应，可将其简化为 3 个阶段，分述如下即羧化、还原和 RuBP 再生阶段。

羧化阶段：CO_2 被还原之前首先被固定形成羧基，以 RuBP 作为 CO_2 接受体，在 RuBP 羧化酶的催化下使 CO_2 与 RuBP 通过 C_6 中间物然后转变为 2 分子 PGA。RuBP 羧化酶不仅催化羧化反应，同时也催化加氧作用，故此酶应称为 RuBP 羧化酶加氧酶(ribulose－1,5－bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco)，CO_2 与 O_2 对该酶有竞争，所以 CO_2/O_2 的比值决定羧化反应的水平。该酶有 8 个大亚基由叶绿体基因编码和 8 个小亚基由核基因编码，在每一个大亚基上有催化部位及调节部位，而小亚基则增加大亚基的活性。该酶占叶内可溶性蛋白的 50%以上，大约占叶绿体蛋白的 15%。据研究者推算在世界上约有 4×10^{10} kg Rubisco，可以看出该酶是很丰富的。

还原阶段：PGA 首先在磷酸甘油激酶催化下被 ATP 磷酸化形成甘油酸－1,3－双磷酸，再在甘油醛磷酸脱氢酶催化下被 NADPH 还原形成甘油醛－3－磷酸。羧基被还原成醛基，自由能变化较大，是吸能反应。光反应中形成的 ATP 及 NADPH 主要是在这一阶段被利用。所以还原阶段是光反应与暗反应的连接点。一旦 CO_2 被还原成磷酸甘油醛，光合作用的贮能过程便完成。假如 3 分子 CO_2 被 3 分子 RuBP 接受，经过还原可以形成 6 分子 C_3 糖，其中 5 分子 C_3 糖再生原剂量 RuBP，只有 1 分子 C_3 糖作为光合作用初级产物，它可以运往细胞质中并转变为光合产物——蔗糖，或留在叶绿体中转变为淀粉暂时贮藏。

RuBP 再生阶段：利用形成的甘油醛－3－磷酸经过一系列的转化(图 5－28)，最终再生核酮糖－5－磷酸，然后在磷酸核酮糖激酶的作用下发生磷酸化作用形成 RuBP，此处所用的 ATP 也是在光反应中产生的。

卡尔文—本森循环有一个重要特征是，它有自动催化(autocatalysis)的能力，它能够增加 CO_2 接受体的数量来代替正常产物。通常反应是：

$$6CO_2+6RuBP\longrightarrow12C_3\longrightarrow6Ru-5-P+C_6\text{糖}$$

在特定情况下该循环可以重新排列反应使 Ru－5－P 代替 C_6 糖：

$$5CO_2+5RuBP\longrightarrow10C_3\longrightarrow5Ru-5-P+Ru-5-P$$

一个反应不仅能产生它本身的底物，而且产生的比用掉的还多，这当然是自动催化反应。假如在羧化反应之后的一系列反应只能产生和它所利用的数量相等的底物，它就没有能力调整光合速率以应付改变的环境，有自动催化能力，就能增加它的开始物质的浓度，这样就可以加速其本身的运转。

5.2.3 叶绿体 DNA

Chiba(1951)以卷柏(*Selaginella savatieri*)、白花紫露草(*Tradescantia fluminienis*)和紫万年青(*Rhoeo discolor*)等为材料，对它们叶绿体中的 DNA 进行了研究，发现在叶绿体中有能被孚尔根(Feulgen)染色的区域。这表明叶绿体中可能具有 DNA。但该结果一般不能

被重复。这是由于大多数叶绿体内 DNA 的浓度是在孚尔根方法所能检测的浓度之下。随后又有一些研究如 Ris 等(1962)以衣藻为材料,用电镜观察其超薄切片,发现在基质中电子密度比较低的区域有 2.5～3.0 nm 的纤丝,如用 DNA 酶预处理,则纤丝消失。根据这些纤丝与在细菌的质粒中的 DNA 纤丝相似的结果,研究者们认为叶绿体中的纤丝也含有 DNA。随后研究者们在菜豆(*Phaseolus*)和甜菜(*Beta vulgaris*)及许多种植物和藻类叶绿体基质中发现均有对 DNA 酶敏感的纤丝。

5.2.3.1 叶绿体 DNA 的基本性质

高等植物叶绿体 DNA(chloroplast DNA, cp 或 ctDNA)一般是双链环状分子,其周长随种类而不同,大约在 40～46 μm,相对分子质量也随植物种类不同而变动,变动范围在 8.5×10^7～1.4×10^8,含 120～190 kb(千碱基对)。对高等植物 DNA 碱基组成分析的结果,其 GC 值(DNA 中的鸟嘌呤和胞嘧啶在 4 种碱基中所占的摩尔%)多为 37%～38%。

叶绿体 DNA 在化学上的特点是它们不含 5′甲基胞嘧啶,而且不与组蛋白络合。这些特性与核 DNA 不同,而是与细菌的 DNA 相似。

每个质体中 DNA 的重量,对高等植物来说一般范围在 3×10^{-15}～8×10^{-15} g。用自显影法和电镜对甜菜不同发育时期的叶绿体进行研究,发现每个质体 DNA 含量粗略地与质体体积增加成正比。当叶绿体直径为 1.5 μm 时,每质体的基因组拷贝数为 10,成熟叶绿体基因组的拷贝数为 20～50,再大的叶绿体和一些藻类此数量可以再增多。

5.2.3.2 叶绿体 DNA 的结构及功能

结构:大多数植物 cpDNA 的一个明显特征是存在一对反向重复序列(inverted repeat sequence),简称 IR 序列,这一对 IR 被一个大单拷贝(large single copy, LSC)区及一个小单拷贝(small single copy, SSC)区分开(图 5－29)。但也有例外,如豌豆、蚕豆的 cpDNA 就缺乏 IR。而裸藻的 cpDNA 具有 3 个串联的重复序列,其中每一个重复序列都含有一个 rRNA 基因簇。因此,cpDNA 可分为 3 种类型,类型Ⅰ缺少重复序列;类型Ⅱ存在一对反向重复序列;类型Ⅲ含有串联重复序列。

功能:cpDNA 提供少量但很重要的与叶绿体的生物合成功能有关的遗传信息。

在 cpDNA 上存在的基因按照它的产物功能可分为两组:一组是为遗传信息的表达,包括 rRNA、tRNA 和一些核糖体蛋白编码的基因;另一组所包括的是为在叶绿体中起功能作用的蛋白质编码的基因,例如为 PSⅡ、PSⅠ、Cyt bf 复合体、CF_1-CF_0ATP 合酶和 Rubisco 等的一些亚单位编码。

高等植物叶绿体的 rRNA 有 4 种,即 23S、16S、5S 和 4.5S,它们都是由叶绿体基因编码的。大多数植物的这些基因位于 cpDNA 的反向重复区域。

现已证明,叶绿体中含有的 tRNA 分子均由叶绿体基因编码。已在烟草和玉米 cpDNA 中发现有 30 种 tRNA 基因(trn)。这 30 种 tRNA 基因足以完成在叶绿体合成蛋白质的任务,而不需从细胞质中输入 tRNA 分子。

叶绿体的核蛋白体含有大约 60 种核蛋白体蛋白,其中仅有 1/3 是由 cpDNA 编码的。cpDNA 编码的基因包括 7 个大亚基蛋白基因(rpl)和 12 个小亚基蛋白基因(rps)。

根据资料分析,叶绿体中的结构蛋白、光合作用所需的酶蛋白以及合成糖、脂肪和蛋白质的酶蛋白中仅少部分是由叶绿体本身的 DNA 编码。目前对类囊体膜上蛋白质对应的基

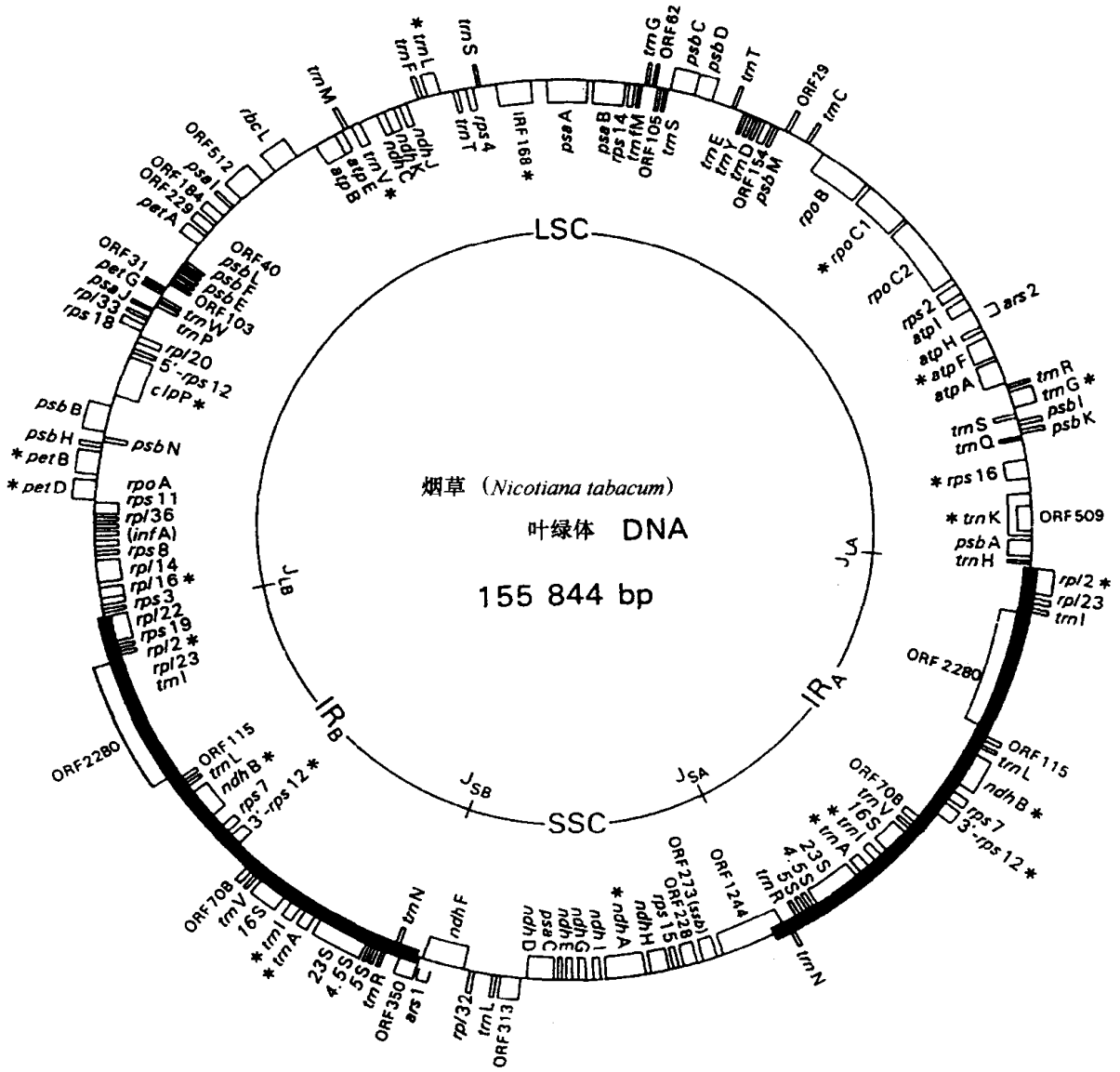


图 5-29 烟草叶绿体基因组的基因图

环内侧所示的基因以顺时针方向转录，环外侧基因以逆时针方向转录，星号表示分裂基因，粗线表示 IR(引自 M. Sugiura, 1992)

因场所相比之下了解得较清楚。

PSⅠ核心复合物约由 14 种多肽组成(图 5-25)，其中 5 种是由叶绿体基因编码，即亚单位 1a、1b、Ⅶ、Ⅸ和Ⅷ，其编码的基因名称分别为 *psa A*、*psa B*、*psa C*、*psa J*、*psa I*。

PSⅡ核心复合物约由 18 种多肽组成(图 5-26)，其中至少 13 种是由叶绿体基因组编码，即亚单位 D_1、CP 47、CP 43、D_2、cyt $b_{559}\alpha$、cyt $b_{559}\beta$、PsbH、PsbI、PsbJ、PsbK、PsbL、PsbM 和 PsbN，其编码基因名称分别为 *psb A*、*psb B*、*psb C*、*psb D*、*psb E*、*psb F*、*psb H*、*psb I*、*psb J*、*psb K*、*psb L*、*psb M*、*psb N*。

Cyt bf 复合物由 5 个不同的多肽组成，其中 3 个由叶绿体基因组编码，其编码基因名称分别为 pet A、pet B、pet D。

ATP 合酶的 CF_1 部分由 5 种多肽组成，其中 3 种即 α、β 和 ε 由叶绿体基因组编码，其编

码基因名称分别为 *atp A*、*atp B*、*atp E*。CF_0 部分由 4 种多肽组成其中Ⅰ、Ⅲ和Ⅳ多肽链由叶绿体基因编码，其基因名称分别为 *atp F*、*atp H*、*atp I*。

在叶绿体基质中进行着大量的代谢过程，如糖代谢、SO_4^{2-} 和 NO_2^- 还原、氨基酸的形成以及脂肪酸、类萜和叶啉合成等等。它们所需要的多种酶类，其中只有 Rubisco 的大亚基已鉴定是由 cpDNA 编码，其编码的基因名称为 *rbc L*。

由以上的事实使人们认识到，叶绿体外的胞质环境对叶绿体十分重要。它并不只表现为是质体自我控制下生长和分裂的介质，而且表现了对细胞核有特殊的依赖，才能使其自身继续生存。虽然很多实验证明了叶绿体中含有 DNA，但是很多重要蛋白质是依赖细胞核中的 DNA 及细胞质中蛋白质合成系统形成蛋白输送到叶绿体。所以，叶绿体是个半自主性的细胞器。

内 容 提 要

线粒体和叶绿体是细胞内两个能量转换的细胞器。线粒体广泛存在于各类真核细胞中，叶绿体存在于植物细胞中。线粒体的形态、大小、数量和分布与细胞类型、所处的生理条件及能量需求有关，其结构特征主要呈封闭的双层膜结构，内膜经折叠形成了其特征性扩增的结构系统——嵴。在线粒体的基质中含有催化生化大分子物质代谢的多种酶类和核糖体、基因组 DNA 和 RNA 等。

线粒体的主要功能是参加三羧酸循环中的氧化反应，进行电子和能量转换，行使氧化磷酸化作用。由 NADH 到 O_2 的呼吸链（或电子传递链）主要包含黄素蛋白、铁硫蛋白、辅酶 Q、细胞色素，从 NADH 到 O_2 的电子传递过程中，电子按氧化还原电位从低向高传递，最终将 O_2 还原为 H_2O。在内膜电子传递链各组分和 ATP 合酶的作用下，每一个 NADH 通过电子传递链传递给 O_2 的过程形成 3 个 ATP，每一个 $FADH_2$ 被氧化产生 2 个 ATP。氧化磷酸化作用机理有“化学渗透假说”、“构象假学”等。化学渗透假说认为呼吸链电子传递过程中生成的质子不能自由通过内膜，由此形成线粒体内膜两侧的质子动力势，这种势能驱动 ATP 合酶合成 ATP。“构象假说”认为在质子流驱动下，ATP 合酶的构象发生变化，从而进行 ATP 合成与释放。

线粒体是半自主性细胞器。它含有 DNA 并能进行转录与转译。由线粒体 DNA 编码的蛋白质数量少，大多数蛋白质是由细胞核基因编码、在细胞质核蛋白体中合成。在细胞质中线粒体蛋白质被合成后输送入线粒体各部位是一个多步骤、由多种蛋白参与且需能量的过程。热休克蛋白等“分子伴娘”在跨膜运送、解折叠和重新折叠过程中起重要作用。线粒体通过已有线粒体的生长与分裂进行繁殖。线粒体功能的异常与疾病、衰老、细胞凋亡密切相关。不少线粒体疾病是由于线粒体 DNA 突变与功能缺陷所致。

叶绿体是植物通过光合作用将光能转变为人类可利用的化学能的场所，它独特的功能与其结构密切相关，其内部结构最突出的特征是具有复杂的层膜系统。在电镜下观察到其基本结构均为双层膜组成的类似扁平的囊，故称类囊体。在类囊体膜上具有由光能转变为化学能所需的功能组分，它们分别组装在 5 种膜蛋白复合物中，并分别分布在一定区域。

当叶绿素吸收光能传递到作用中心色素（在 PSⅠ为 P 700，PSⅡ为 P 680）发生原初光化学反应即电荷分离，从而引起电子传递，其传递途径称为 Z 链。在 Z 链中，最终电子供体

为水，最终电子受体为 $NADP^+$，因此在这个过程中形成了 NADPH，同时偶联 ATP 的形成。因此，光反应过程中产生 ATP 及 NADPH，它们被用于暗反应过程中 CO_2 还原成糖之需。CO_2 被还原成糖的基本途径称为卡尔文－本森循环，该循环共 13 个反应，可分为 3 个阶段。首先是 CO_2 被固定形成 PGA，然后是 PGA 被还原形成糖，第 3 阶段为 CO_2 接受体的再生。

在叶绿体基质中有 DNA 纤丝存在。但叶绿体中很多重要蛋白质需要核中的 DNA 及细胞质中蛋白质合成系统形成后运送到叶绿体中，因此，是半自主性的细胞器。

思 考 题

1. 试述线粒体和叶绿体的结构特征并比较其异同点。
2. 试述线粒体的氧化磷酸化和叶绿体的光合磷酸化作用。
3. 为何说 ATP 合酶是氧化磷酸化的关键装置？
4. 为何说线粒体和叶绿体是半自主性细胞器？
5. 为何说在细胞质中线粒体蛋白质合成后输送至线粒体各部位是一个多步骤、由多种蛋白参与且需能量的过程？

参 考 资 料

1. 杨福瑜. 细胞生物学进展. 第 3 卷. 线粒体. 北京：高等教育出版社，1993. 1～27
2. Alberts B, *et al*. Essential Cell Biology, an introduction to the molecular biology of the cell. New York and London: Garland Publishing, Inc, 1998. 407～446
3. Karp G. Cell and Molecular Biology. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, Inc, 1999. 182～211
4. Alberts B, *et al*. Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. New York and London: Garland Publishing, Inc, 1994. 653～720
5. Lodish H, *et al*. Molecular Cell Biology. 3rd ed. New York: Scientific American Books, 1995. 739～777, 809～830
6. Mathews C K, Van Holde K E. Biochemistry. 2nd ed. The Benjamin / Cummings Publishing Company Inc, 1996. 520～553
7. Boyer P D. The binding change mechanism for ATP synthase – some prehabilities possibilities. Biochem Biophys Acta, 1993, 1140, 215～250
8. Pfanner N, *et al*. The protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. Trends Biochem Sci, 1994, 19: 368～372
9. Stuart R S, *et al*, Mitochondrial molecular chaperones. Their role in protein translocation. Trends Biochem Sci, 1994, 19: 87～92
10. Kluck R M. *et al*. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl－2 regulation of apoptosis. Science, 1997, 275: 1132～1136
11. Green D R, Read J C. Mitochondria and apoptosis. Science, 1998, 281: 1309～1312
12. Schon E A, *et al*. Mitochondrial DNA mutation and pathogenesis. J. Biomembrane and Bioeneergetics, 1997, 29(2): 131
13. Wallace D C. Mitochondrial diseases in man amd mouse. Science, 1999, 283: 1482～1487
14. Dey P M, Harbosen J B. eds. Plant Biochemistry. 1997

第6章

细胞骨架

细胞骨架(cytoskeleton)一般是指真核细胞质内的蛋白质纤维网架系统。广义的细胞骨架包括细胞质骨架、细胞核骨架及细胞膜骨架。这种系统和我们自身的骨架不同,细胞骨架是一种高度动态的结构,它们不仅是细胞的"骨骼",也是细胞的"肌肉"。因此,它不仅对维持细胞的形态、保持细胞内部结构的有序性起重要作用,而且还与细胞运动、物质运输、能量转换、信息传递、细胞分裂、免疫行为、细胞分化等生命活动密切相关。细胞骨架存在于各类真核细胞中,为什么长时间没被发现呢?这是因为过去做超薄切片是用锇酸或高锰酸钾在0~4℃下固定,这些条件都能使蛋白纤维解聚。1963年改进用戊二醛并在室温下固定以后,才广泛地观察到各类细胞骨架纤维的存在。

目前,细胞骨架的研究已从形态观察为主迅速推进到分子结构、功能和调节(包括基因的调节)的研究,并已取得了许多突出进展,它正在进一步更新着人们对整个细胞结构和功能的概念。

细胞骨架是由3种类型的蛋白质纤维组成的网架:微丝、微管及中等纤维。微丝是由肌动蛋白构成的,微管是由微管蛋白构成的,一种纤维蛋白家族形成中等纤维。这些细胞骨架分别由成千个不同的有关分子聚合成不同直径而又不分叉的蛋白质纤维。在这一章中,将分别介绍细胞骨架不同成分的结构和功能。

6.1 微 丝

微丝(microfilament, MF)又称肌动蛋白丝(actin filament),是指真核细胞中由肌动蛋白(actin)组成、直径为7 nm的实心纤维。它可以成束、成网或以纤维状分散存在(图6-1)。

6.1.1 微丝的成分及组装

肌动蛋白是微丝的结构成分,相对分子质量为4.3×10^4,具有3种异构体,即α、β和γ肌动蛋白。人类有6种基因型肌动蛋白(表6-1)和70多种肌动蛋白结合蛋白家族。肌动蛋白是一种在进化上极为保守的蛋白。低等动物的肌动蛋白能与人的肌动蛋白形成杂交分子;不同来源的肌动蛋白其氨基酸顺序差别很小,在α肌动蛋白的约375个氨基酸残基中,

各种类型肌肉的肌动蛋白之间，只相差 4～6 个残基，这些不同的肌动蛋白显然是来自一个先祖基因。

表 6－1 人类肌动蛋白的基因家族

基因类型	基因数	染色体分布
α 骨骼肌肌动蛋白	1	1
α 心肌肌动蛋白	1	未知
α 平滑肌肌动蛋白	1	10
β 细胞质肌动蛋白	1	7
γ 细胞质肌动蛋白	1	17
γ 平滑肌肌动蛋白	1	2

（自 T. D. Pollard）

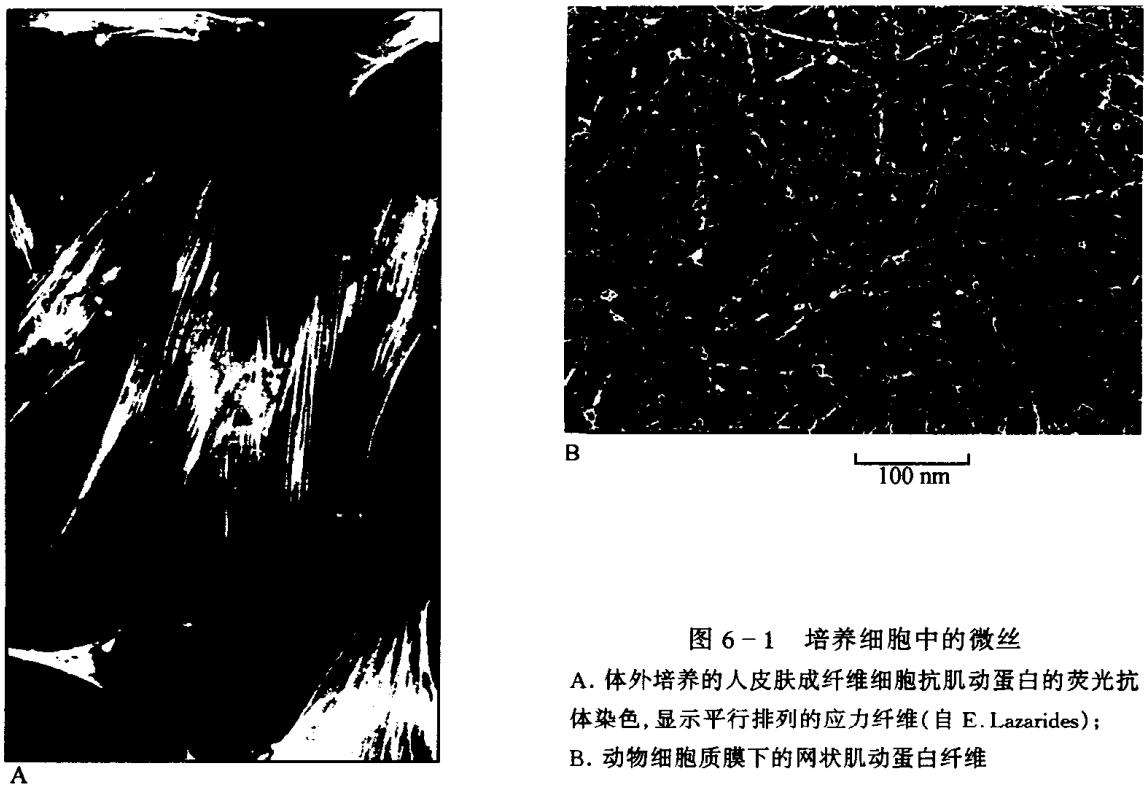


图 6－1 培养细胞中的微丝

A. 体外培养的人皮肤成纤维细胞抗肌动蛋白的荧光抗体染色，显示平行排列的应力纤维（自 E. Lazarides）；

B. 动物细胞质膜下的网状肌动蛋白纤维

组装：微丝是由肌动蛋白亚单位（G－actin）组成的螺旋状纤维（F－actin），每 37 nm 拧成一圈。每个肌动蛋白分子是接近球形的，它具有极性。F－肌动蛋白组装时，呈头尾相接，故微丝也是具有极性的（图 6－2）。

微丝的组装必须在一定的盐浓度（主要是 Mg^{2+}）、一定的 G－肌动蛋白浓度和 ATP 存在下才能进行。若在 Ca^{2+} 以及很低浓度的 Na^+、K^+ 溶液中，微丝趋向于解聚成 G－肌动蛋白；而在 Mg^{2+} 和高浓度的 K^+ 或 Na^+ 的溶液诱导下，G－肌动蛋白则装配成纤维状肌动蛋白（F－肌动蛋白）。

微丝的组装过程分为两个阶段，即种子形成（成核）和延长阶段。种子形成需要一定的时间，这段时间叫延迟时间。这段时间内 G－肌动蛋白开始聚合，形成二聚体时，仍不稳定，易解聚，当聚合成三聚体时才稳定，即种子形成。一旦种子形成，G－肌动蛋白便立即迅速地在种子两端聚合上，此时便进入延长阶段。聚合快的一端为正极，另一端为负极（图 6－3）。

ATP 的作用主要表现在延长阶段，1 个 G－肌动蛋白分子可结合 1 个分子 ATP，结合

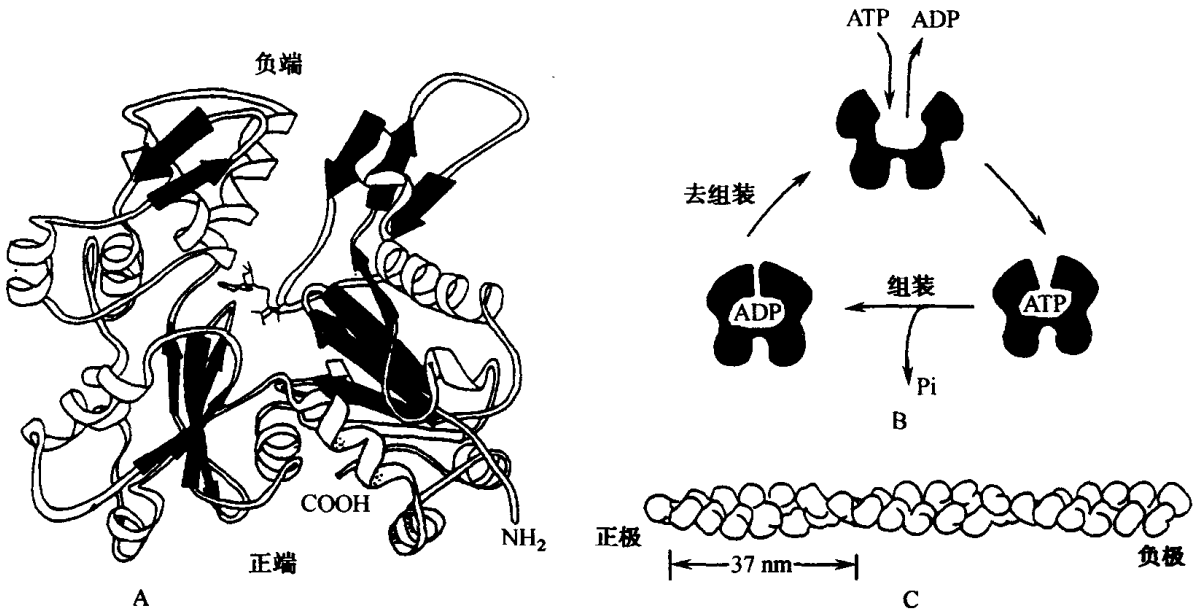


图 6－2　肌动蛋白及微丝的极性

A. 根据 X 射线衍射推断的肌动蛋白分子立体结构；B. 肌动蛋白的河蚌状结构，ATP 结合位点处于分子内部；C. 在微丝中所有单体的极性指向同一方向，故微丝也具有极性，多聚体螺旋周期的距离为 37 nm(A 仿 W. Kabsch, 等；B 仿 B. Alberts, 等)

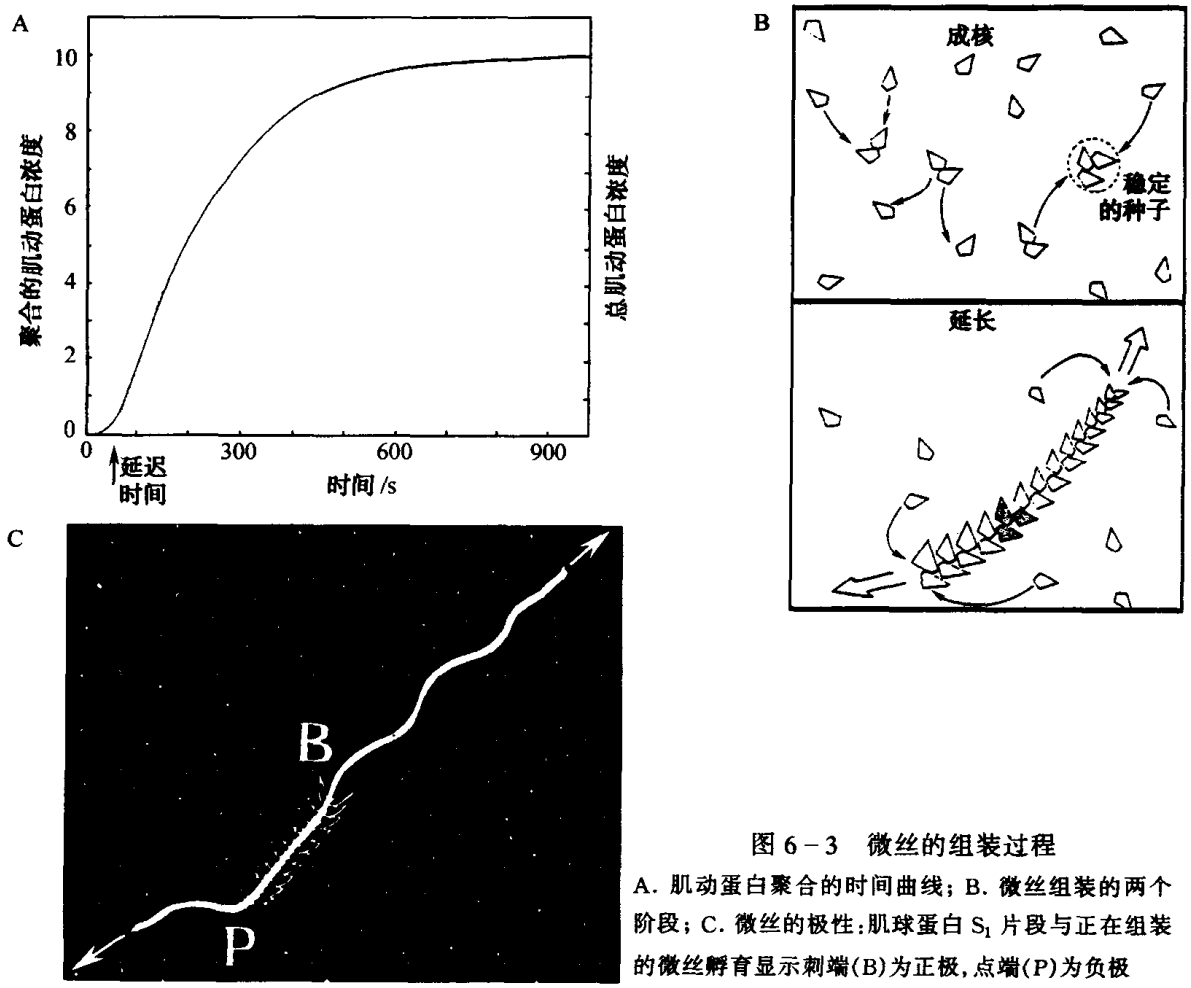


图 6－3　微丝的组装过程

A. 肌动蛋白聚合的时间曲线；B. 微丝组装的两个阶段；C. 微丝的极性：肌球蛋白 S_1 片段与正在组装的微丝孵育显示刺端(B)为正极，点端(P)为负极

ATP 的肌动蛋白——ATP 肌动蛋白对纤维末端的亲和力高，当 ATP 肌动蛋白结合到末端后，使肌动蛋白构象改变，然后 ATP 水解为 ADP 和 Pi。而 ADP 肌动蛋白对纤维末端的亲和力低，容易从末端脱落，使纤维缩短。ATP 肌动蛋白浓度与其聚合速度成正比，当 ATP 肌动蛋白浓度高时，ATP 肌动蛋白在末端聚合的速度大，由于 ATP 水解为 ADP 和 Pi 在稍后发生，从而在纤维末端形成一连串的 ATP 肌动蛋白，被称为 ATP 帽(ATP cap)，而在近纤维中部为 ADP 肌动蛋白。当 ATP 肌动蛋白不断耗竭，其浓度下降时，ATP 肌动蛋白在末端的聚合速度便下降，而 ATP 水解为 ADP 和 Pi 的速度不变，结果使 ATP 帽不断缩小而消失，最后暴露出 ADP 肌动蛋白，由于 ADP 肌动蛋白对末端的亲和力小，结果 ADP 肌动蛋白不断从末端解聚脱落，使纤维缩短(图 6－4)。因此，在肌动蛋白溶液中，其 F－肌动蛋白是由带 ATP 帽和失去 ATP 帽的两类纤维组成，即一些纤维在延长，而另一些则在缩短。ADP

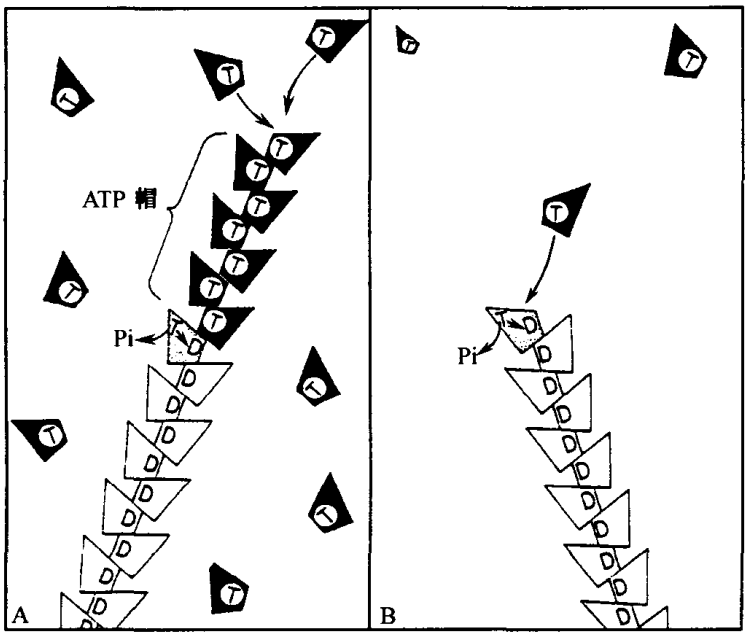


图 6－4 微丝组装中 ATP 的作用
A. ATP 肌动蛋白浓度高时，ATP 帽形成；
B. ATP 肌动蛋白浓度低时 ATP 帽消失；
T 和 D 分别代表 ATP 和 ADP

肌动蛋白从 F 肌动蛋白解聚脱落后，其 ADP 可被 ATP 置换重新形成 ATP 肌动蛋白参加聚合，一些缩短的纤维在其末端可重新形成 ATP 帽再延长。因此，就每一根纤维来说，其长度一般不是固定不变的，它不是延长便是缩短，呈动力学不稳定状态。据此，Carlier 等人在 1984 年提出了“动力学不稳定模型”(dynamic instability model)学说，该学说解释微丝的迅速重组具有一定的合理性(图 6－5)。

在一定的肌动蛋白浓度下，F 肌动蛋白正极聚合的速度与负极解聚速度相等，使 F 肌动蛋白处于平衡状态，其纤维的长度不变，新聚合上的肌动蛋白单体从正极向负极作踏车式移动，这种现象称为踏车模型(treadmilling model)(图 6－6)。

微丝特异性药物：微丝组装和去组装的能力是肌动蛋白纤维适应多种功能的需要。例如，在细胞运动中的作用，肌动蛋白纤维的功能可被一些药物所扰乱——可用细胞松弛素 B (cytochalasin B, CB, 是真菌的一种代谢产物)阻止肌动蛋白的聚合，CB 结合到微丝的正极，阻止新的单体聚合，同时改变负极的临界浓度，致使亚单位从微丝解聚。故 CB 可引起微丝网的解体，并进一步使肌动蛋白结成一些大的团块。鬼笔环肽(phalloidine)是一种由毒覃产生的双环杆肽，与微丝有强的亲和作用，它能稳定肌动蛋白纤维，阻止其组装，并可促进微丝

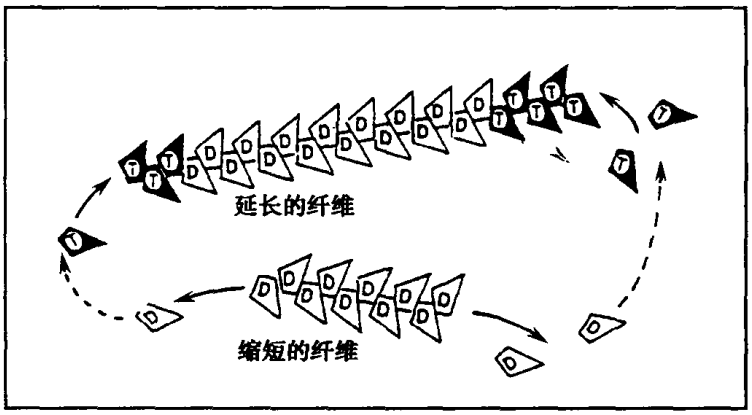


图 6－5 根据 F－肌动蛋白组装的动力学不稳定模型

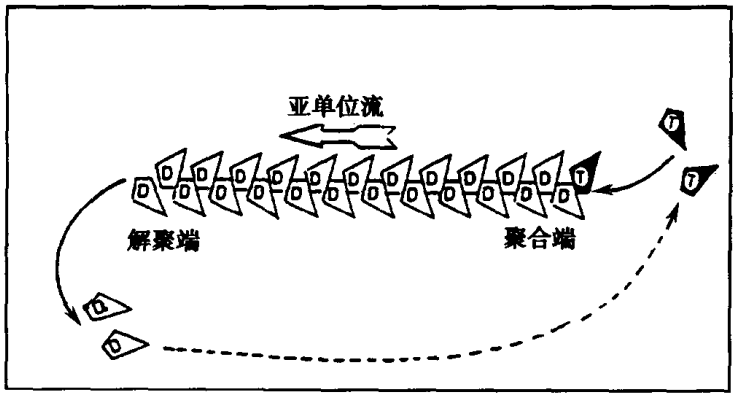


图 6－6 微丝组装的踏车模型

的聚合，稳定既成的微丝纤维。

6.1.2 微丝结合蛋白

肌动蛋白微丝在微丝结合蛋白(microfilament-associated protein)的协同下，可以形成多种不同的亚细胞结构，如应力纤维、肌肉肌原纤维、小肠微绒毛的轴心以及精子顶端的刺突等。这些结构的形成，以及它们的变化和功能状态，都在很大程度上受到不同的微丝结合蛋白的调节。这些结合蛋白，按其功能可分为几类：一类与 F－肌动蛋白的聚合有关，如胸腺素(thymosin)和前纤维蛋白(profilins)，属隔绝蛋白，它们在溶液中和 G－肌动蛋白结合，阻止肌动蛋白的聚合，但前纤维蛋白由于可使 ATP 和 ADP 发生置换，从而提高 ATP 肌动蛋白浓度，最终促进其聚合；另一类是与微丝结构有关的，如截断蛋白(fragmenting protein)，它们的作用是可以打断肌动蛋白纤维，使之成为短的片段，并且结合在断点上，使之不能再进行连接，另外还有一种细丝蛋白(filamin)是一种细而长的线状分子，使微丝连接成网状；第三类是与微丝收缩有关的蛋白，例如，与肌肉收缩有关的结合蛋白有肌球蛋白(myosin)、原肌球蛋白(tropomyosin)和肌钙蛋白(troponin)等。现已发现的微丝结合蛋白有多种，其中一些重要的结合蛋白及其功能见表 6－2 和图 6－7。

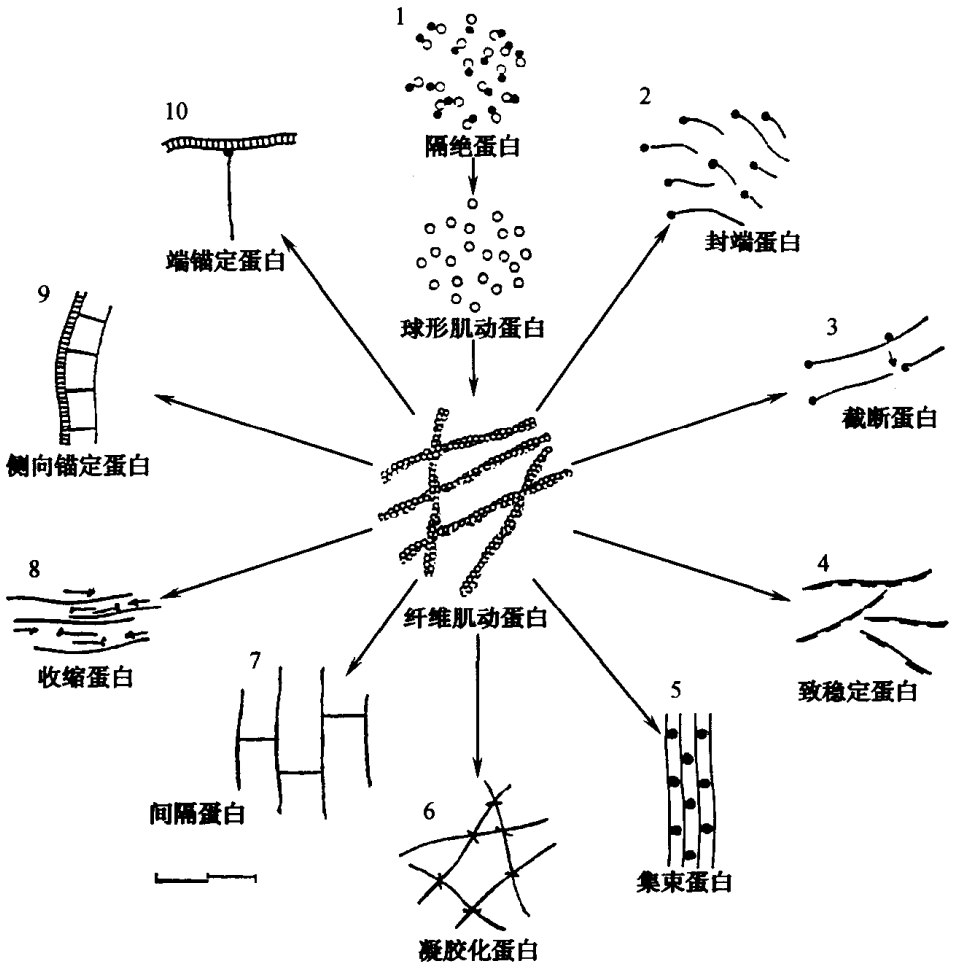


图 6-7 微丝结合蛋白功能示意图(引自 Weber, Osborn, 1985)

表 6-2 微丝结合蛋白

分类	结合蛋白	功 能
与聚合有关	前纤维蛋白	结合于 G-肌动蛋白,促进组装,也属隔绝蛋白
	绒毛蛋白(villin)	低 Ca^{2+} 时促进形成微丝组装核心
	胸腺素	结合于 G-肌动蛋白单体,抑制组装
	封端蛋白(capping protein)	结合于微丝末端,阻止 G-肌动蛋白在此端的聚合或解聚
与结构有关		
截断蛋白	凝溶胶蛋白	低 Ca^{2+} 时促进组装,高 Ca^{2+} 时将微丝打成片段
	绒毛蛋白(villin)	作用同上
横连蛋白	丝束蛋白(fimbrin)	在平行微丝间形成连接,使成束
	细丝蛋白	使微丝连成网状,属凝胶化蛋白
锚定蛋白	纽蛋白	将微丝束固定在质膜上
	α辅肌动蛋白	在微丝正端横向连接成束,也参与微丝与膜的结合
与收缩有关	肌球蛋白	头部与微丝接触,使微丝运动
	原肌球蛋白	结合于肌肉细丝,调节肌动蛋白与肌球蛋白头部的结合

6.1.3 微丝的功能

6.1.3.1 肌肉收缩

肌肉收缩机制的研究是从分子水平研究细胞、组织、器官的结构与功能的成功范例，说明生物的结构和功能运作是生物体内的分子活动所致。

横纹肌的亚显微结构，组织学中已有详尽阐述，本章不再赘述。

横纹肌细胞是一种特别富含细胞骨架成分、效率特别高的能量转换装置。肌细胞的收缩单位是肌原纤维(myofibrils)，肌原纤维由粗丝和细丝组装形成，粗丝的成分是肌球蛋白，细丝的主要成分是肌动蛋白，辅以原肌球蛋白和肌钙蛋白。肌节(sarcomere)则是肌原纤维的基本收缩单位(图 6－8、6－9、6－10)。肌球蛋白属马达蛋白(motor proteins)，其家族成员中包括肌球蛋白Ⅰ(myosinⅠ)和肌球蛋白Ⅱ(myosinⅡ)两个成员(图 6－10)。肌球蛋白Ⅰ是一个单分子，有一个球形头部和一个杆状的尾部，头部有运动活性，其尾部可以附着在其他分子、质膜或膜性囊泡上。粗丝的成分为肌球蛋白Ⅱ，肌球蛋白Ⅱ是由一对相同的肌球蛋白分子组成，由两个球状的头部和一个互为螺旋的尾部组成。两个肌球蛋白Ⅱ分子尾对尾地向相反方向排列，即尾部在中央，头部在两侧，再平行聚合成束。

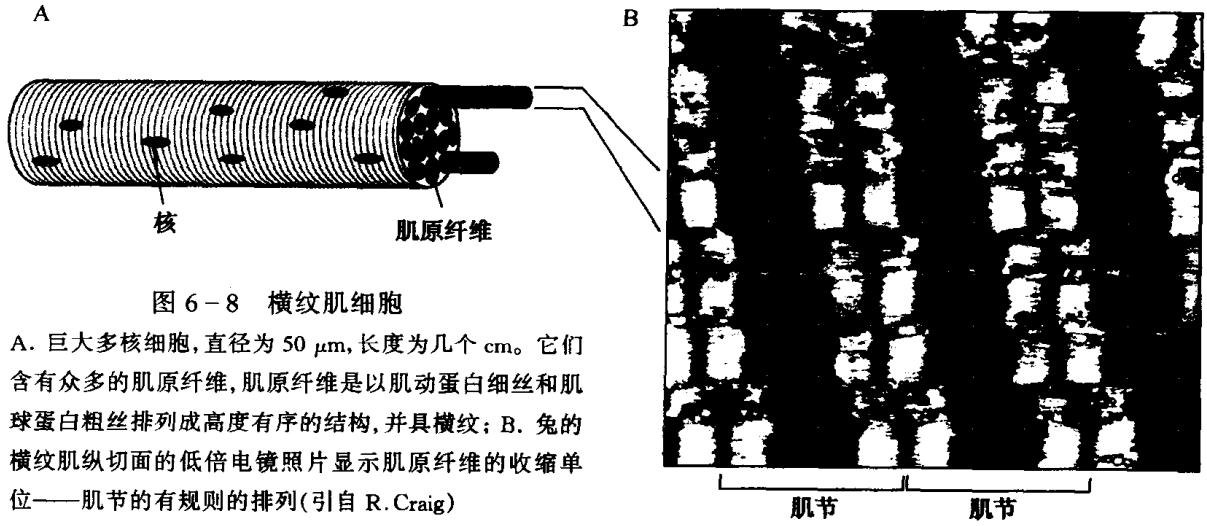


图 6－8 横纹肌细胞

A. 巨大多核细胞，直径为 50 μm，长度为几个 cm。它们含有众多的肌原纤维，肌原纤维是以肌动蛋白细丝和肌球蛋白粗丝排列成高度有序的结构，并具横纹；B. 兔的横纹肌纵切面的低倍电镜照片显示肌原纤维的收缩单位——肌节的有规则的排列(引自 R.Craig)

肌肉细胞的收缩是由全部肌节的同时缩短所引起的，其实质只是肌动蛋白细丝与肌球蛋白粗丝间的滑动，他们的长度没有改变(图 6－9)。滑动动作的产生靠其肌球蛋白指向两侧的头部与邻近的肌动蛋白细丝相互作用。当肌肉受刺激发生收缩，肌球蛋白头部开始沿肌动蛋白细丝反复地、周期性地附着和去附着，使肌动蛋白细丝和肌球蛋白粗丝彼此拉过来，由此引起肌节收缩。一次收缩完成后，肌球蛋白头部完全同肌动蛋白细丝脱离接触，则肌肉松弛。

在每一个附着与去附着的周期中，肌球蛋白头部结合并水解一个 ATP 分子。这一水解过程引起肌球蛋白分子一系列构象的变化，导致肌球蛋白分子头部尖端沿线状肌动蛋白的正极位移 5 nm。随着 ATP 分子的反复水解，推进肌球蛋白分子沿着肌动蛋白细丝单向滑行(图 6－11)。这样，肌球蛋白头部拉动肌动蛋白细丝，引起它顺着肌球蛋白粗丝滑动。每一根肌球蛋白粗丝大约有 300 个肌球蛋白头部附着；每一个头部每秒钟约可进行 5 个附着

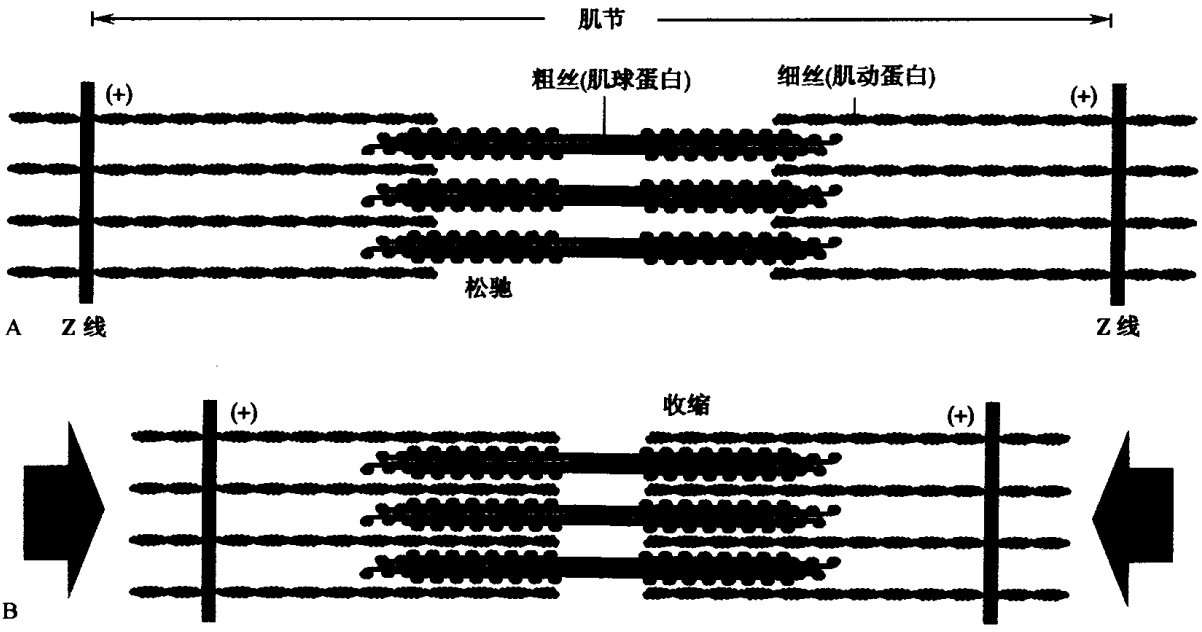


图 6－9 肌肉收缩的滑丝模型

A. 肌节的肌球蛋白粗丝和肌动蛋白细丝以同样的相对极方向彼此重叠排列在中线的两侧，肌动蛋白细丝附着在正极的 Z 线上，而肌球蛋白粗丝是双极的；B. 当收缩时，肌动蛋白和肌球蛋白本身并不缩短，只是相对滑动，其滑动是由肌球蛋白头部朝向肌动蛋白细丝的正极移动引起的(引自 B. Alberts, 等)

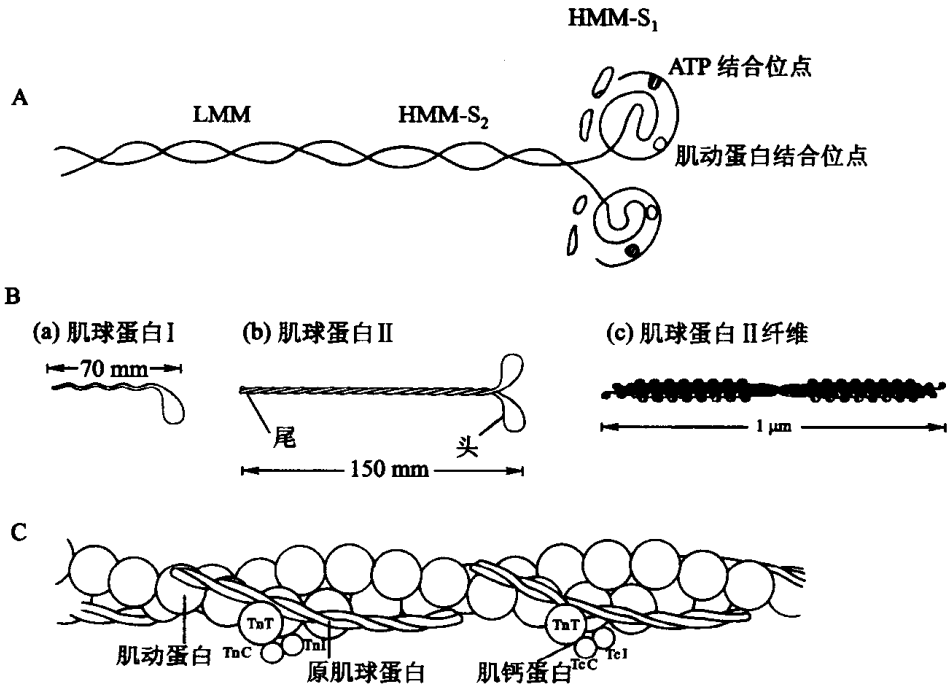


图 6－10 肌原纤维内粗丝和细丝的分子结构示意图

A. 肌球蛋白分子：由两个多肽链形成的，长 140 nm，其一端为 S_1 头部，另一端为尾部(LMM：轻酶解肌球蛋白；HMM－S_2：重酶解肌球蛋白 S_2；HMM－S_1：重酶解肌球蛋白 S_1)；B. 粗丝：由肌球蛋白组装而成的(a)肌球蛋白 I 是一个单分子，(b)肌球蛋白 II 是由一对相同的肌球蛋白分子组成，(c)两个肌球蛋白 II 分子尾对尾地向相反方向排列，即尾部在粗丝的中央，头部在两侧，多个再平行聚合成肌球蛋白纤维；C. 细丝：由肌动蛋白单体、原肌球蛋白和肌钙蛋白结合而成，注意每一个原肌球蛋白伸展覆盖到 7 个肌动蛋白分子上

去附着周期，使得肌球蛋白粗丝和肌动蛋白细丝之间的滑动速度达到 15 μm/s。这一速度足以使肌节在不到 0.1 s 内由充分舒展状态(3 μm)转化成充分收缩状态(2 μm)。肌肉的所有肌节都是偶联在一起的，并几乎在瞬间被下面所描述的信号系统同时触发。因此整个肌肉收缩极为迅速，通常在 0.1 s 内完成。

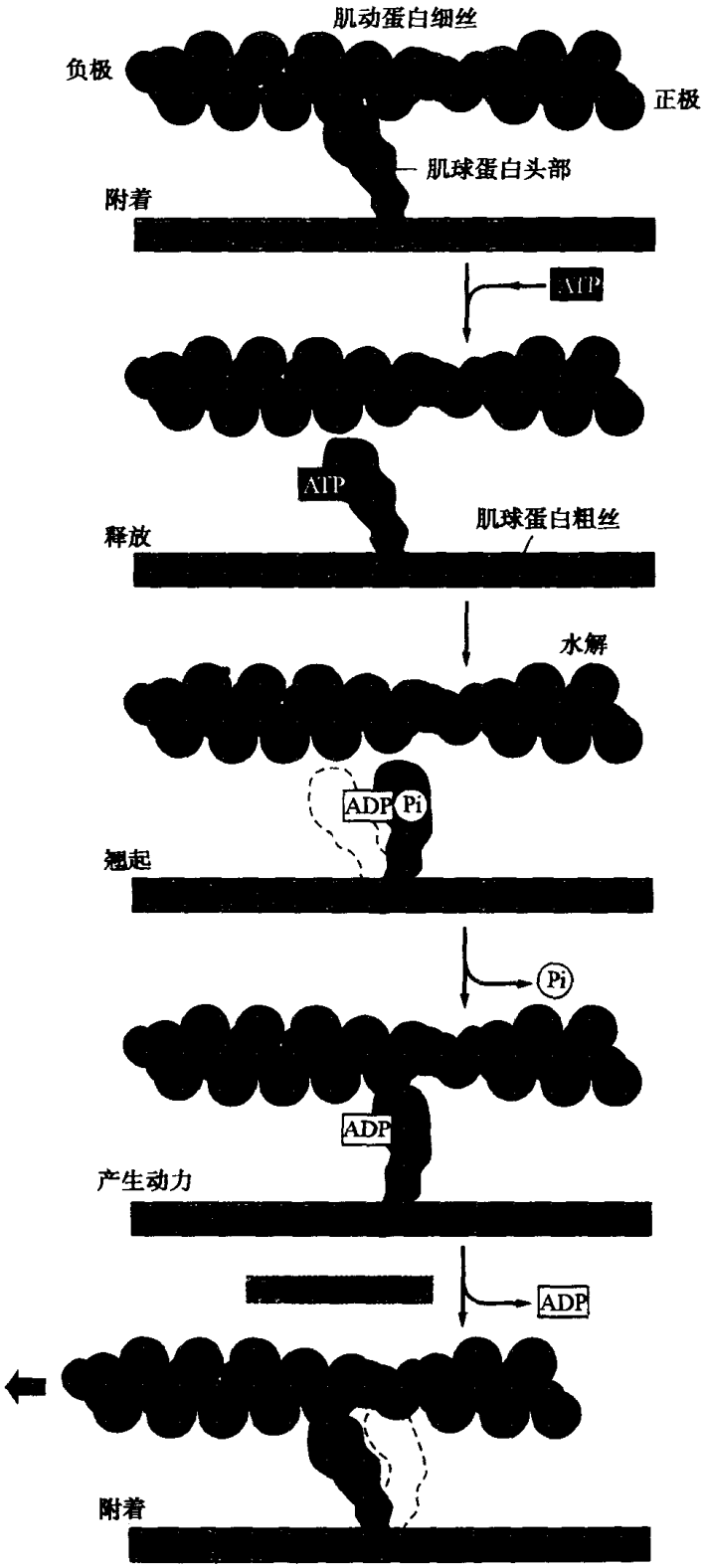


图 6－11　肌球蛋白分子沿肌动蛋白细丝滑动的周期变化

附着——周期开始时，肌球蛋白头部牢牢地锁定在一根细丝上，成为一种挺直的构型。在收缩的肌肉中这种活化状态非常短，它可以由于结合一个 ATP 分子而迅速终止。

释放——一个 ATP 分子结合到肌球蛋白头部，立即引起肌球蛋白和肌动蛋白结合位点构象的轻微变化，使头部和肌动蛋白的亲和力减小，同时头部沿细丝运动(在头部和肌动蛋白之间这里画出一个空隙，主要强调出这种变化，在真实的情况下头部可能与肌动蛋白保持非常紧密的结合)。

翘起——由于头部的 ATP 水解成 ADP 和 Pi 引发一个大的形状改变，使头部沿着肌动蛋白作大约 5 nm 的移位，产物 ADP + Pi 仍紧密和头部结合。

产生动力——肌球蛋白头部与下一个肌动蛋白位点之间的疏松结合引起 ATP 的水解产物无机磷的释放，随之头部与肌动蛋白之间更牢固地结合。这种产物的释放触发动力冲程——产生一种力使肌球蛋白头部回到原始的结构状态(形状)。在这种动力冲程过程中，其头部失去 ADP，因而转回到新的周期的开始状态。

附着——在周期之末，肌球蛋白头部又牢牢地锁定在细丝上，成为一种挺直的结构。注意这时的头部已经移动到细丝的新的位置

(引自 B. Alberts, 等)

到目前为止,收缩系统的分子结构至少有 4 种蛋白与肌肉收缩有关:即肌球蛋白、肌动蛋白、原肌球蛋白和肌钙蛋白。

1. 肌球蛋白:粗丝主要是由肌球蛋白组成,相对分子质量约为 4.8×10^5,它含有两个多肽的重链(每个相对分子质量约为 2.0×10^5)和 4 个较小的各 2.0×10^4 左右的轻链(图 6-10A)。肌球蛋白由头部和杆部两个区构成。杆状部由部分重链构成,结构为双股 α 螺旋,通过分子间杆状区的侧向结合,肌球蛋白可聚合成两极纤维;头部区由部分重链和轻链构成,含有两个头,其上有肌动蛋白和 ATP 的结合位点,并具 ATP 酶活性。当肌球蛋白的分子聚合成两极纤维时,头部构成纤维的侧向突起,并指向纤维的两极(图 6-10B)。

2. 肌动蛋白:肌动蛋白细丝是由呈螺旋形的链组成的,每 36~37 nm 一圈。在肌肉中,肌动蛋白主要是以 F 肌动蛋白形式存在。肌动蛋白细丝的组成是很复杂的,因为它还含有原肌球蛋白和肌钙蛋白(图 6-10C)。

3. 原肌球蛋白:原肌球蛋白分子细而长,由两条多肽链相互缠绕成螺旋状,也具极性。它们首尾相连,形成长丝,位于肌动蛋白细丝双螺旋的沟内。一个原肌球蛋白的分子长度相当于 7 个肌动蛋白单体。它的作用是遮蔽肌动蛋白单体上的活性区,从而抑制肌动蛋白与肌球蛋白的结合及相互作用。

4. 肌钙蛋白:每一个原肌球蛋白的分子上附有一个肌钙蛋白,它含有 3 个相对分子质量相等的亚基,分别为:原肌球蛋白结合亚基(Tn T),可与原肌球蛋白结合;抑制亚基(Tn I),可与肌动蛋白结合,阻碍肌动蛋白与肌球蛋白之间的结合;钙结合亚基(Tn C),可与 Ca^{2+} 结合。

肌钙蛋白中 3 个亚基的空间构型与 Tn C 是否与 Ca^{2+} 结合十分有关。当 Tn C 与 Ca^{2+} 结合时,3 个亚基的空间构型发生变化,使原肌球蛋白分子更深地陷入肌动蛋白纤维螺旋沟内。结果肌动蛋白单体上可与肌球蛋白结合的部位暴露出来,细丝可与粗丝的横桥(即肌球蛋白头部)相结合,从而引发粗丝与细丝间的滑动,使肌节缩短,即肌肉收缩(图 6-11)。当 Tn C 与 Ca^{2+} 解离时,肌钙蛋白的 3 个亚基又恢复原来的空间构型。此时,肌动蛋白的单体上与肌球蛋白结合的位点又被原肌球蛋白所遮蔽。因此,细丝无法与粗丝的横桥相互作用,导致肌肉松弛(图 6-12)。由此可见,肌钙蛋白的功能是起调节作用,Ca^{2+} 的升高是触发肌肉收缩的分子机理。

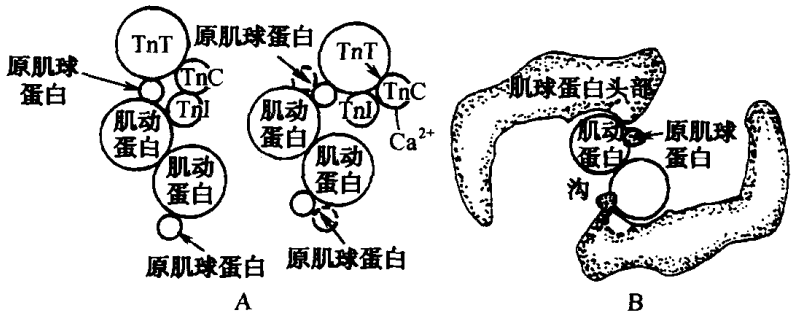


图 6-12 肌肉收缩的分子机理示意图

A. 从细丝横切面看肌动蛋白、肌钙蛋白 3 个亚基与原肌球蛋白之间的排列及 Ca^{2+} 的作用;B. 原肌球蛋白对肌球蛋白头部与肌动蛋白结合的作用
虚线圆圈表示肌肉松驰时原肌球蛋白的位置,实线圆圈表示肌肉收缩时原肌球蛋白的位置

Ca^{2+} 是由肌质网释放的,因为肌质网有收集和释放 Ca^{2+} 的功能。现已研究较清楚,肌质网含有很高浓度的 Ca^{2+} 并可对外来的电信号激发起反应,这些 Ca^{2+} 通过离子通道释放到胞液中。这种通道的打开是由于质膜的去极化产生的动作电位引起的(图 6-13)。Ca^{2+} 从肌质网进入胞液后,迅速提高胞液的 Ca^{2+} 浓度,引起肌肉收缩。当肌质网膜上的 Ca^{2+} -

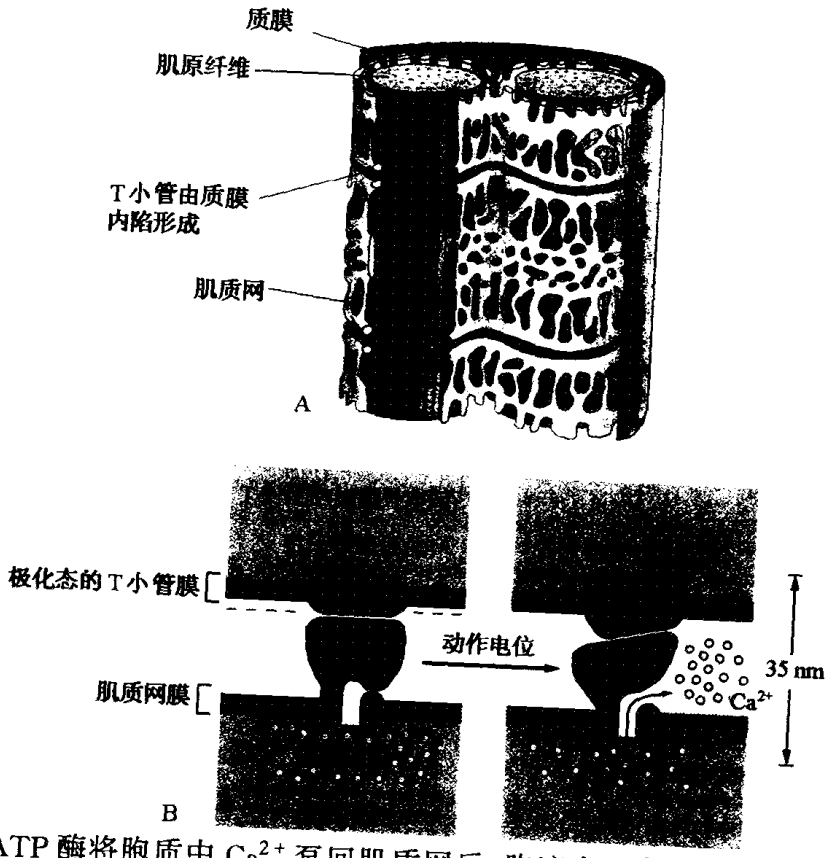


图 6－13　T 小管和肌质网
A. 收缩信号从肌细胞膜到胞内所有肌原纤维的传递的两个膜系统的示意图；B. 肌质网中的 Ca^{2+} 释放通道是如何被邻近 T 小管的电压敏感性跨膜蛋白引起开放的(引自 B. Alberts, 等)

ATP 酶将胞质中 Ca^{2+} 泵回肌质网后，胞液中 Ca^{2+} 迅速下降至原水平，使肌肉收缩停止，处于松弛状态。

在平滑肌中以及在非肌细胞结构中，调节机制与上述情况略有不同。它们不是通过肌钙蛋白，而是通过钙调素(CaM)来传导 Ca^{2+} 的刺激。Ca^{2+} 浓度升高时 CaM 使肌球蛋白轻链激酶活化，从而使轻链磷酸化。这使得肌球蛋白与肌动蛋白结合的 ATP 酶活性大大提高，有利于肌肉收缩。

6.1.3.2　细胞运动

在许多种细胞中，细胞膜下有一层富含肌动蛋白细丝的区域，称为细胞皮质层。一些肌动蛋白结合蛋白，如细丝蛋白，能将不同方向的微丝在其互相交叉的地方连接起来，形成三维网络，这种网络与细胞膜有连接，这种纤维网络层可向细胞膜提供机械强度，并帮助维持细胞形态。在体外系统下，向肌动蛋白溶液加入一定比例的细丝蛋白，促使微丝形成三维网络，从而使肌动蛋白溶液从粘稠的溶胶态变成凝胶态。因此皮质层又可称为凝胶层。大量实验表明，Ca^{2+} 浓度的改变可导致一些肌动蛋白结合蛋白的激活或抑制，如截断蛋白中的凝溶胶蛋白(gelsolin)在较高的 Ca^{2+} 浓度下(从 10^{-7} mol/L 提高到 10^{-5} mol/L)被激活，与肌动蛋白具有强烈的亲和性，以致它们可插入微丝的亚基间，将微丝打断，使微丝三维网架崩解(图 6－14)，从而使凝胶态转为溶胶态，增加胞质的流动性。当 Ca^{2+} 浓度下降时，凝溶胶蛋白活性被抑制，促使肌动蛋白聚合，并激活一些交联蛋白如细丝蛋白，与微丝结合，促使微丝网络的形成，恢复凝胶态。这种转变所需的 Ca^{2+} 浓度通常是在细胞对外界刺激作出反应时才能达到。细胞的各种运动，如胞质环流(cyclosis)、变形虫样运动(ameboid motion)、变皱膜运动(ruffled membrane locomotion)及细胞吞噬活动(phagocytosis)等，都与肌动蛋白的

溶凝胶状态及其相互转化有关。体外培养的动物成纤维细胞在基质表面的位移则涉及一些更为复杂的过程和更精细的结构改变。

上面提到溶胶化伴随增加胞质的流动性，但是什么动力导致胞质流动？若要产生流动，还须依赖于肌球蛋白的作用，即肌球蛋白与微丝结合，并与微丝相互作用，与微丝间产生滑动，从而带动胞质的流动，这一过程是以水解 ATP 为动力的。

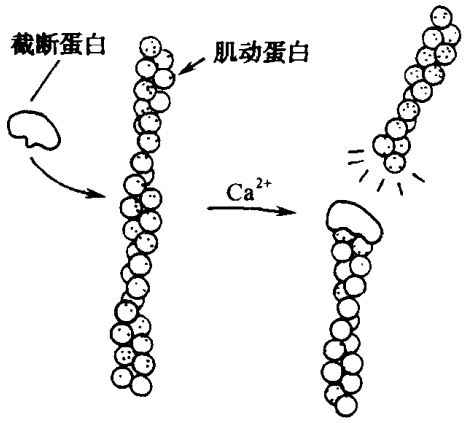


图 6－14 截断蛋白可与肌动蛋白紧密结合，从而插入亚基之间，使微丝变成片段，这一过程是钙依赖性的

6.1.3.3 胞质分裂环

有丝分裂末期，两个即将分裂的子细胞之间产生一个收缩环。收缩环是由大量反向平行排列的微丝组成。随着收缩环的收缩，两个子细胞被分开。胞质分裂后，收缩环即消失。收缩环是非肌细胞中具有收缩功能的微丝束的典型代表。收缩环收紧的动力来自纤维束中肌动蛋白和肌球蛋白的相对滑动，或者说是由肌球蛋白介导的、相反极性微丝之间的滑动。

6.1.3.4 微绒毛

肠上皮细胞微绒毛的轴心是非肌细胞中高度有序微丝束的代表。微丝呈同向平行排列。微丝束下端终止于端网结构(terminal web)。微绒毛中心的微丝束起维持绒毛形状的作用，其中不含肌球蛋白、原肌球蛋白和 α 辅肌动蛋白，因而无收缩功能。微丝结合蛋白如绒毛蛋白、肌球蛋白Ⅰ、钙调蛋白和毛缘蛋白在微丝束的形成、维持及与微绒毛细胞膜连接中起重要作用(图 6－15)。其中肌球蛋白Ⅰ类似于肌球蛋白Ⅱ，其头部也具有 ATP 酶活性，它与微丝和质膜的连接可提供一种张力，这种张力可能用来保持微丝束处于微绒毛中心位置，也可能会使微绒毛发生弯曲。

6.1.3.5 应力纤维

除了微绒毛的核心以外，在许多种细胞中存在另一种较为稳定的肌动蛋白纤维束状结构，称为应力纤维(stress fiber)。如果用抗肌动蛋白荧光抗体染色后，在光镜下能看到一些最大的纤维：由肌动蛋白微丝及多种结合蛋白形成的纤维束，横跨整个细胞，通常在接近细胞底面处沿细胞长轴平行排布(图 6－1)，两端以钮蛋白(vinculin)、肌球蛋白、原肌球蛋白和 α 辅肌动蛋白等结合蛋白将应力纤维抛锚似的固着在细胞膜上。应力纤维的功能可能与收缩和维持细胞形态有关；另一方面，应力纤维表现出与细胞之间或细胞与基质表面的附着有密切关系。因此，多数学者相信，应力纤维可能在细胞形态发生、细胞分化、细胞转化和组织的形成方面具有重要的作用。

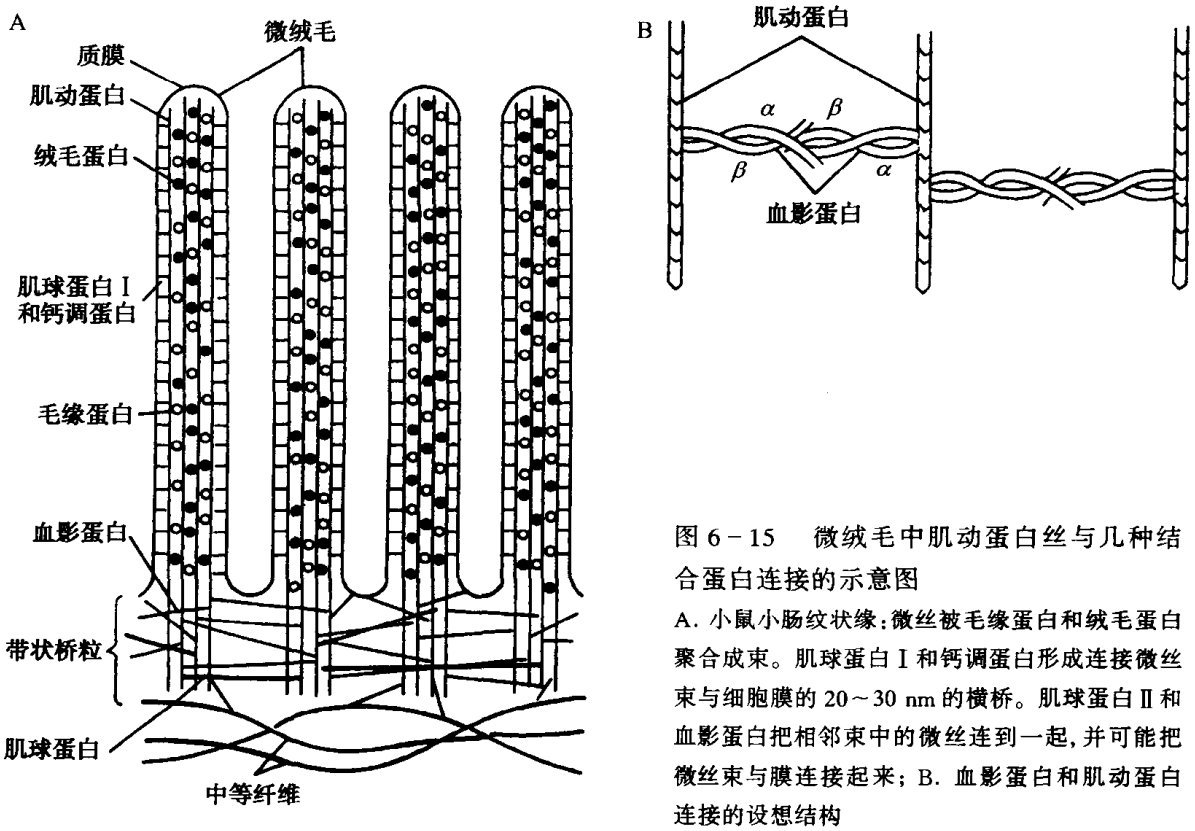


图 6－15　微绒毛中肌动蛋白丝与几种结合蛋白连接的示意图

A. 小鼠小肠纹状缘：微丝被毛缘蛋白和绒毛蛋白聚合成束。肌球蛋白 I 和钙调蛋白形成连接微丝束与细胞膜的 20～30 nm 的横桥。肌球蛋白 II 和血影蛋白把相邻束中的微丝连到一起，并可能把微丝束与膜连接起来；B. 血影蛋白和肌动蛋白连接的设想结构

6.2　微　管

微管(microtubule)存在于所有真核细胞中，是由微管蛋白组装成的长而挺直的中空蛋白质管。细胞内微管呈网状或束状分布，并能与其他蛋白共同组装成纺锤体、基体、中心粒、鞭毛、纤毛、神经轴突等结构，参与细胞形态的维持、细胞运动和细胞分裂。

6.2.1　微管的形态结构

微管是由亚单位——微管蛋白(tubulin)分子构成，每一个亚单位本身是一个二聚体，该二聚体是由非常相似的两个球状蛋白——α 微管蛋白和 β 微管蛋白以非共价键紧密结合而成。许多微管蛋白亚单位再以非共价键结合，形成中空的螺旋盘绕的微管管壁，呈现由 13 根平行原丝(protofilament，或称原纤维)排列成的圆筒状，平均直径为 24 nm，每一条原丝均由 αβ 微管蛋白亚单位组成(图 6－16)。由于每一条原丝有其结构上的极性，α 微管蛋白的一端为负极，另一端 β 微管蛋白为正极。所以赋予整个微管以极性结构。

微管可以组装成单管(细胞质微管)、二联管(纤毛和鞭毛)及三联管(中心粒和基体)。细胞内还有一些微管结合蛋白(microtubule associated proteins，MAPs)，MAPs 分为高相对分子质量及低相对分子质量两类，前者主要包括 MAP1 和 MAP2，后者主要为 Tau 蛋白，此外，还有鞭毛或纤毛中的动力蛋白等。微管结合蛋白的功能有：①稳定微管；②构成微管间的连接，使微管成一定的排列；③使微管与其他结构，主要是膜结构连接；④产生动力。

6.2.2 微管的成分与组装

脊椎动物大约有 6 种 α 微管蛋白和 β 微管蛋白以及大约 12 种微管蛋白的结合蛋白的家族。微管蛋白以 α 和 β 微管蛋白两种单体形式存在，每一种的相对分子质量大约 5×10^4，装配成微管的天然亚单位，是相对分子质量为 1×10^5 的异二聚体。在微管聚合的条件中，以微管蛋白的浓度及 GTP 的存在最为重要。微管蛋白二聚体含有两个 GTP 的结合位点，n 位点(α 微管蛋白)为共价结合，比较稳定；e 位点(β 微管蛋白)为非共价结合，不稳定，可以和溶液中的 GTP 交换。结合 GTP 的微管蛋白对微管末端的亲和力大，易在其末端聚合，GTP－微管蛋白的聚合与其浓度成正比，当 GTP－微管蛋白在末端聚合后，GTP 水解为 GDP，GDP－微管蛋白对微管末端亲和力小，易从末端解聚。当 GTP－微管蛋白的聚合速度大于 GTP 的水解速度时，在微管末端不断增加 GTP－微管蛋白而形成一 GTP 帽，使微管能稳定地延长。随着 GTP－微管蛋白浓度的下降，使 GTP－微管蛋白在末端的聚合速度下降，以致于落后于 GTP 水解速度时，GTP 帽不断缩小以致消失，暴露出 GDP－微管蛋白，引起微管不稳定，迅速解聚而缩短，表现出动力学不稳定性。在某种浓度下，微管正极聚合速度与负极解聚速度相等时，微管长度不变，也表现出踏车行为，其能量是由 GTP 水解提供。

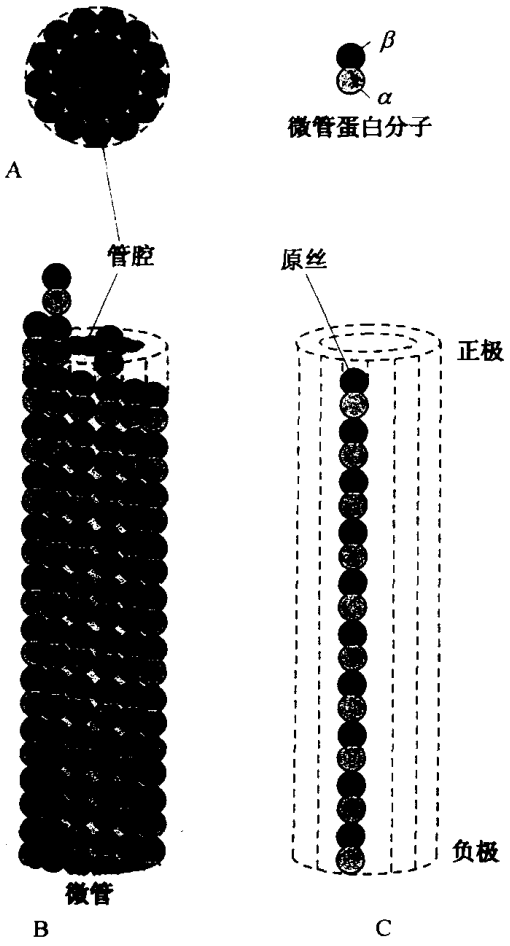


图 6－16 微管的结构

A. 微管的横切面，可见由 13 个微管蛋白二聚体所围成的环形结构；B. 一段微管的侧面图，显示微管蛋白分子如何组装成微管壁；C. 微管蛋白二聚体聚合成原丝，由 13 根原丝围成一段微管。注意在所有排列在原丝中的微管蛋白分子都有相同的方向，因此导致微管也具有极性(引自 B. Alberts, 等)

微管在体外的组装是由独特的核心形成作用和延伸的步骤组成的。主要的组装方式是：先由一些二聚体形成短的原丝，经过在两端和侧面增加二聚体而使之扩展成为片状带，当片状带加宽至 13 根原丝时，即合拢成一段微管。新的二聚体再不断加到这一段微管的端点，使之延长(图 6－17)。微管两端的平衡常数不同，因此两端具有不同的组装速度。组装快的一端称为正(＋)极，另一端为负(－)极。

微管特异性药物，例如秋水仙素(colchicine)是最重要的微管工具药物，它可阻断微管蛋白组装成微管，结合秋水仙素的微管蛋白可结合到微管末端，阻止其他微管蛋白的加入；另一类药物如紫杉酚(taxol)则能促进微管的装配，并使已形成的微管稳定。因此这类药物常被用来研究微管的结构和功能。

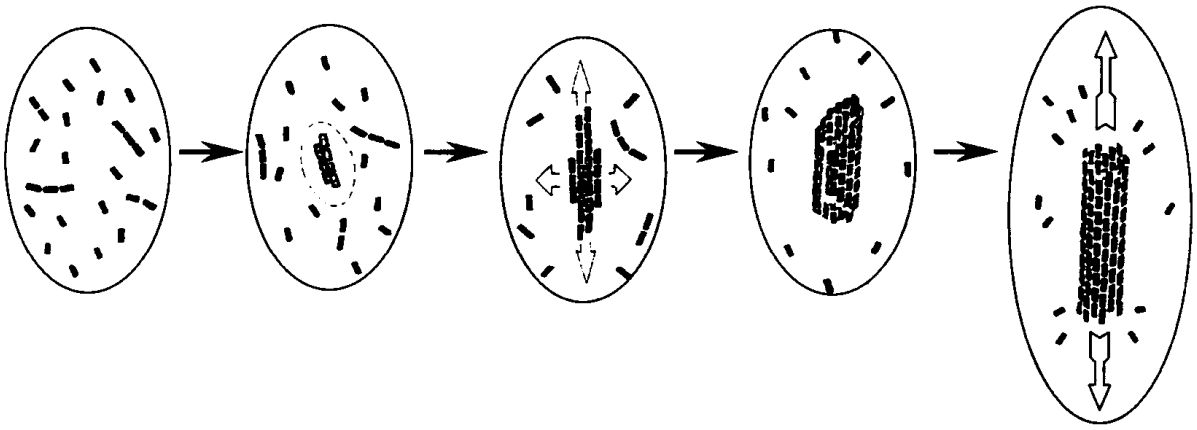


图 6－17　微管装配的成核和延长过程

6.2.3　微管组织中心

细胞质中存在着促成微管蛋白聚合成微管的中心称为微管组织中心(microtubule－organizing center, MTOC),该中心可以控制微管的数量、分布及其方向。例如,动物细胞中的中心体,在细胞间期它位于细胞核的一侧,微管由此生长成辐射状向外排列(图 6－18)。中心体含有几百个由另一类微管蛋白——γ 微管蛋白所形成的环状结构,每一个 γ 微管蛋

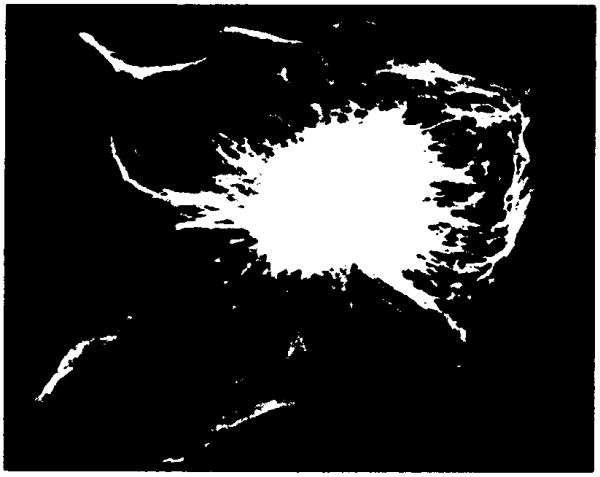


图 6－18　成纤维细胞间期微管的免疫荧光图像
(自 E. Lazarides)

白的环作为一个微管生长的出发点或叫做核心化位点(图 6－19A)。αβ 微管蛋白二聚体以一种特殊的排列方式加到 γ 微管蛋白的环上,结果是每一根微管的负极埋在中心体中,仅仅从朝外的一端的正极生长(图 6－19B)。

中心体中的 γ 微管蛋白环和中心粒(centriole)不能混淆,在大部分动物细胞中,中心粒这种特殊结构是以短的微管排列成圆筒状结构,包埋在中心体中,中心粒不起微管的核心化作用(仅 γ 微管蛋白环起核心化作用),它们的功能仍然不清楚,特别是植物细胞没有中心

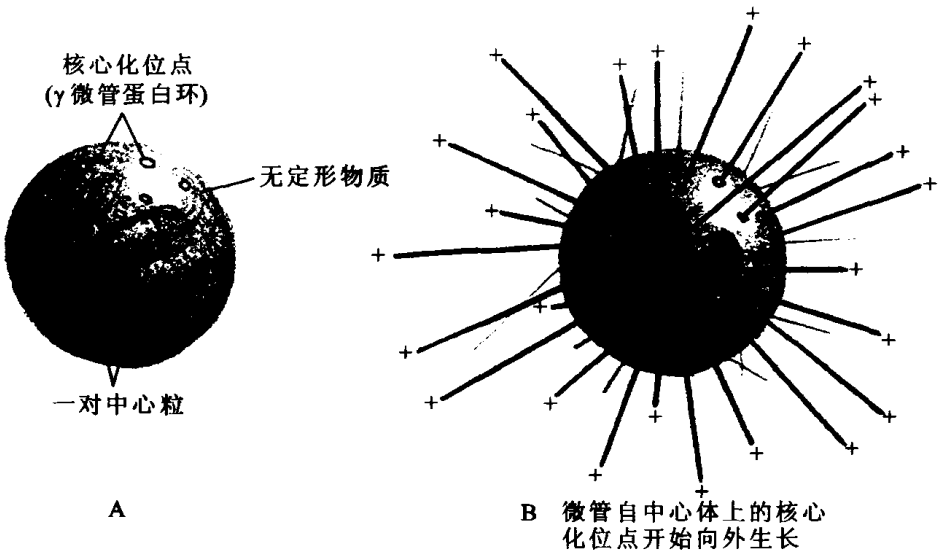


图 6－19 中心体上的微管蛋白的聚合

A. 示意图显示中心体除含有中心粒外，其无定形的基质蛋白含有微管生长核心——γ微管蛋白环；B. 中心体上带有附着的微管，每一个微管的负极埋于中心体中，并从核心环向外生长，而正极则游离于细胞质中(仿 B. Alberts, 等)

粒，但它们仍然可以形成微管。

6.2.4 微管的功能

微管的功能有：①构成细胞内的网状支架，维持细胞的形状；②细胞内物质运输；③鞭毛和纤毛运动；④纺锤体和染色体运动；⑤基体和中心体的移动。

6.2.4.1 鞭毛和纤毛运动

鞭毛(flagella)和纤毛(cilia)是细胞表面的特化结构，使细胞适应于液态环境中的运动。两者的结构基本相同。纤毛短而多，鞭毛长而少。

1. 鞭毛和纤毛轴线的结构

鞭毛和纤毛的微管与细胞质微管稍有不同，轴线(axoneme)是其基本微管结构，同时也是主要的运动单位。通过一根纤毛的横切面，显示 9 对周围双联微管成一环状围绕着一对中央微管排列(图 6－20)。这种“9＋2”排列是几乎所有真核细胞鞭毛和纤毛的结构特征，包括从原生动物一直到人类都是一样。

双联微管间有 10°的倾斜，因此亚纤维 A 比亚纤维 B 更接近于轴。亚纤维 A 的微管较小，但较完备，有 13 个亚单位；而亚纤维 B 的微管较大，但不完备，只有 11 个亚单位。再者，亚纤维 A 具有突起，称做动力蛋白臂(dynein arms)，组成它们的动力蛋白，是一种高分子具 ATP 酶活性的蛋白($3.0\times10^5\sim4.0\times10^5$)，它们是使纤毛产生运动的关键蛋白。

其次，双联微管之间还存在一种细丝连接，称为微管连丝蛋白(nexin)。其功能可能与滑行运动时维持其几何学上的结构完整性有关。

第三种结构是放射辐条(radial spokes)。图 6－20B 中可以观察到亚纤维 A 与中央微管蛋白鞘之间具有放射连结，这些辐条终止于一个致密的头部。辐条在纤毛不弯曲的区段以

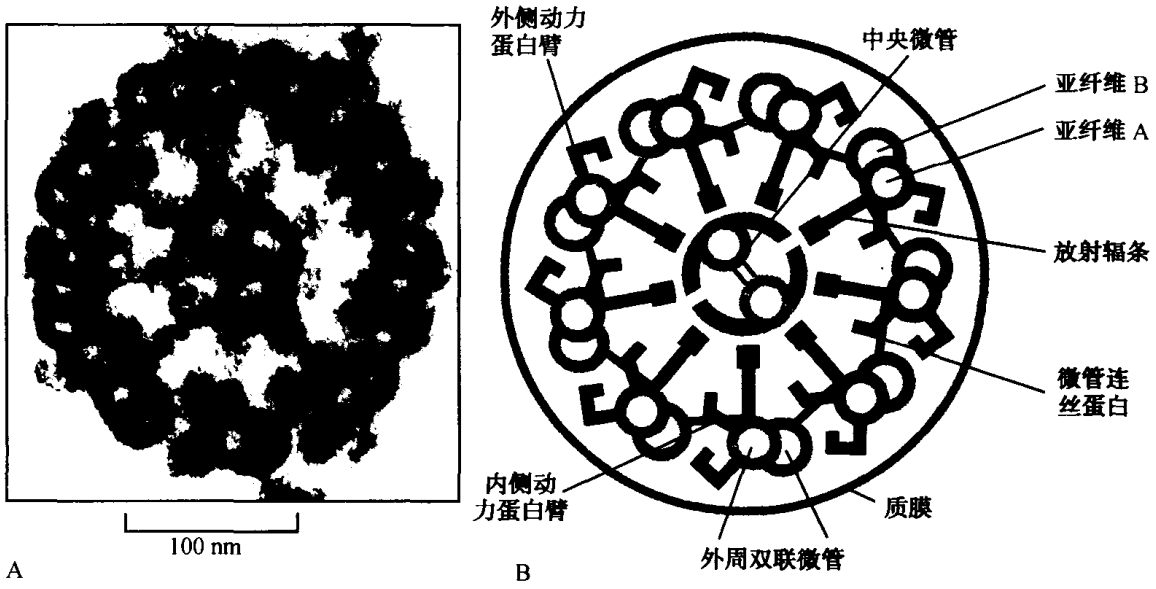


图 6－20　鞭毛和纤毛中微管的排列

A. *Chlamydomonas* 鞭毛横切面的电镜照片，示微管“9＋2”的排列；B. 鞭毛横切面示意图，9 对外周微管各带有两个动力蛋白臂。这些动力蛋白的头部为成对臂状，伸向邻近的微管。这些动力蛋白头部周期性地和邻近的微管相接触，并沿相邻微管运动，因而可以使纤毛的鞭打产生力。通过动力蛋白与微管间的互相滑动而产生弯曲（引自 B. Alberts，等）

垂直方向连到纤毛轴上；而在弯曲的区段则相对地脱开。因此提出一种假说，认为这些辐条可能在周围双联微管进行鞭毛的弯曲时，在轴之间的位移中起作用。

2. 鞭毛（纤毛）运动——双联体微管通过动力蛋白滑动的机制

目前，鞭毛（纤毛）运动中的滑动机制被广泛接受，并且对于这种滑动运动的分子机制也有了相当多的了解。

图 6－21 显示鞭毛运动中微管滑动机制，每一次循环包括 4 个步骤：①动力蛋白头部与相邻亚纤维 B 的接触促进动力蛋白上结合的 ATP 水解产物的释放，同时造成头部角度的改变。在鞭毛中实际是牵拉相邻的亚纤维 B 向鞭毛的顶端方向滑动；②新的 ATP 的结合，使头部与亚纤维 B 脱开；③ATP 水解放出的能量使头部的角度复原（这是一个能量较高的“姿态”）；④带有水解产物的头部与相邻亚纤维 B 上另一个位点结合，开始又一次循环。

我们知道，鞭毛运动表现为波动或摆动，也就是说鞭毛的某些部位要发生弯曲运动，关于这种弯曲运动，现在的研究认为，弯曲运动是由滑动运动转化而来的。上面提到动力蛋白只能使得两个双联管之间产生滑动，最多导致鞭毛的伸长。那么是什么原因使得鞭毛产生弯曲运动呢？这主要是双联微管之间还存在有连丝蛋白，使微管彼此束缚在一起，这样使得自由微管之间的简单的平行滑动变为鞭毛的弯曲运动（图 6－22）。

6.2.4.2　维持细胞形态

维持细胞形态是最早被证实的微管功能。用秋水仙素破坏微管，导致细胞变圆，说明微管对维持细胞的不对称的形状是重要的。细胞突起部分，如纤毛、鞭毛、轴突的形成和维持，微管也起关键作用。

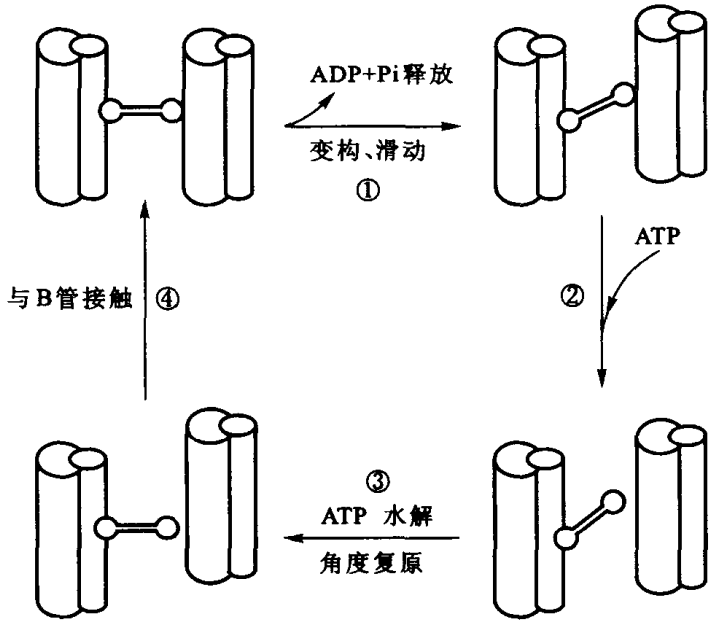
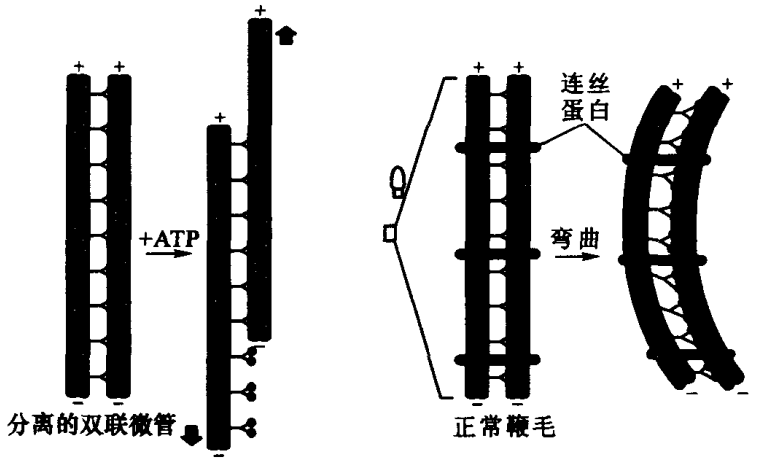


图 6－21 动力蛋白的头部与微管上相邻一组双联体 B 管接触，具有结合活性示意图



A 动力蛋白使微管产生滑动　　B 动力蛋白引起微管弯曲

图 6－22 动力蛋白运动引起鞭毛弯曲

A. 如果把外周双联微管和它们相连的动力蛋白从精子鞭毛其他组分中分离出来，加入 ATP，则双联微管就会由于动力蛋白的反复作用而互相滑动；B. 在一条完整的鞭毛中，双联微管由于被柔韧的连丝蛋白所束缚，因此最终使这一体系产生弯曲(引自 B. Alberts, 等)

6.2.4.3 细胞内运输

1. 细胞内的微管组织：细胞在特殊需要时可改变微管的动力学不稳定性。例如，细胞进入有丝分裂，微管则变得更加动态，它们可以迅速解聚，然后再组装成纺锤体；另一方面，当细胞分化成为一种特殊细胞类型时，可以产生一种特定的结构，这时微管的动力学不稳定性通常被结合于微管末端或者沿着微管长度结合的一些蛋白所抑制，以稳定微管，对抗解

聚,这种稳定的微管则有利于维持细胞的结构。

许多分化的动物细胞具极性,例如,神经细胞从细胞的一端伸出轴突,另一端为树状突起。细胞的极性是细胞内极性化的微管体系的一种反映,它们帮助细胞器定位在必要的位置,同时也引导物质从细胞的一部分向另一部分流动。例如,在神经细胞中,所有轴突中的微管都指向同一方向,其正极朝向轴突的末端(图 6－23)。沿着这些有序的径迹,细胞骨架本身慢慢地向远端运动;同时提供细胞器和可溶性成分运动的轨迹。例如,膜性囊泡和分泌蛋白,这些东西都在胞体合成,需要时转运到轴突。

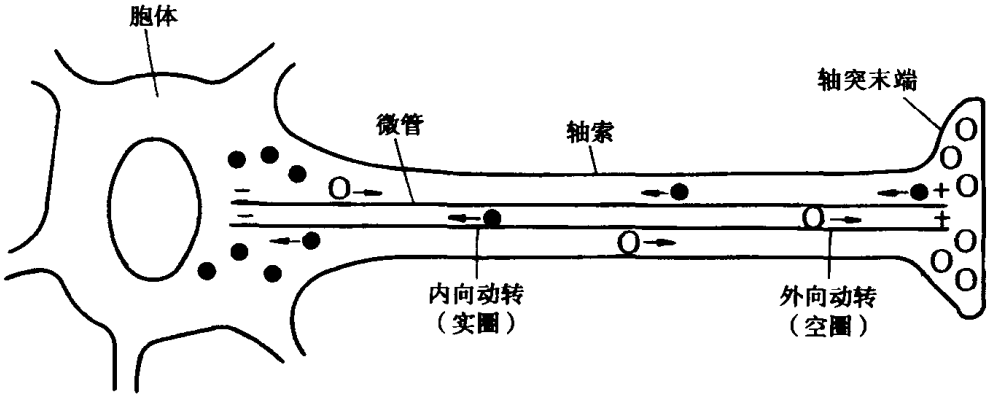


图 6－23 神经细胞轴突中的微管及其对物质运输的作用

在神经细胞轴突中所有的微管(1～几百根)其正极都指向轴突的末端。这些定向微管作为物质转运的轨道,这些物质是在胞体中合成而轴突末端需要的(例如生长需要的膜蛋白)。从一根轴突经过脊髓到肩部肌肉,要经过大约 2 天的时间。此外,还有一套马达蛋白(空圈)可使物质外向转运,另一套反向的马达蛋白(实圈)使物质内向转运。内向转运的是轴突前端摄取的物质或是一些蛋白质分解产物以及其他返回胞体分子(引自 B. Alberts, 等)

这些物质移动的速度一天超过 10 cm,而在某些动物中可能需要用一周乃至更长时间输送到轴突的终端。但是物质沿着微管移动要比自由扩散速度更快,更有效。一个蛋白质分子通过全程,如果只是靠自由扩散要用几年才能达到轴突的终端。

2. 马达蛋白(motor proteins)驱动细胞内物质运输:上面提到微管可以作为物质运输的轨道,单根微管上的物质运输可以是双向的。在神经轴突运输中两个家族马达蛋白分子已经得到纯化:一种是驱动蛋白(kinesin),大约有 40 个基因,驱动蛋白利用 ATP 水解释放的能量向正极运输物质;另一种是胞质动力蛋白(dynein),驱动物质向负极运输。胞质动力蛋白和鞭毛动力蛋白不同的是前者具有两条重链,因而有两个球状头部,而后者有 3 条重链,因此有 3 个头部,驱动蛋白和动力蛋白两者均有两个具有 ATP 结合位点的球状头部和一个尾部(图 6－24)。其头部是以立体的方式与微管相接触;因而,驱动蛋白附着在微管上仅仅是以"点"的方式直接接触;马达蛋白的尾部一般和某些组分,例如膜性囊泡或细胞器,根据物质的不同可以不同方式成为稳定的结合。由此,马达蛋白可以决定所运载物质的类型(图 6－25)。驱动蛋白和动力蛋白的球状头部带有 ATP 酶活性,其头部的构象改变为它与微管相结合、脱离、再结合的周期性活动提供能量。

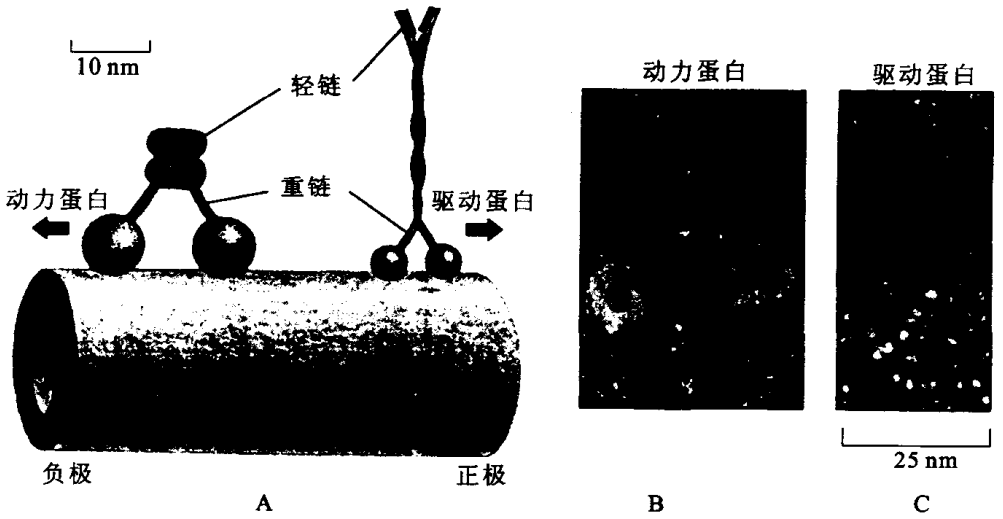


图 6－24 微管马达蛋白

A. 驱动蛋白和动力蛋白是微管马达蛋白，一般两者沿着微管作相反方向的运动，这些蛋白都是由两个相同的重链及几个小的轻链所组成的复合物，每一个重链形成的球状头部和微管相互作用；B. 动力蛋白分子的冰冻蚀刻电镜照片；C. 驱动蛋白分子的冰冻蚀刻电镜照片（A 仿 B. Alberts, 等；B 和 C 自 J. Heuser）

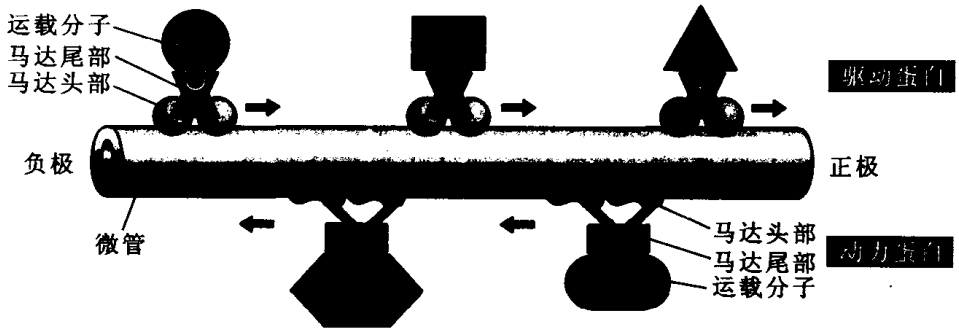


图 6－25 马达蛋白沿微管转运物质

驱动蛋白沿着微管走向正极端，而动力蛋白走向负极端。两种类型微管马达蛋白尾部以多种形式运输不同物质（仿 B. Alberts, 等）

6.3 中等纤维

中等纤维（intermediate filament, IF）是一类结构上相似而组成上不同、长的、通常无分支的胞质纤维，它是一种坚韧而柔软的蛋白质纤维（图 6－26）。最初在平滑肌细胞中被发现，其直径在 10 nm 左右，介于粗丝和细丝之间，故有时也被称为居间纤维。中等纤维是细胞中最稳定的、最不易溶解的成分。用高浓度的盐溶液或非离子去垢剂处理时，大部分细胞骨架都崩解，唯有中等纤维仍保留下来。中等纤维大约有 31 种人类中等纤维蛋白以及 5 个中等纤维结合蛋白家族。

6.3.1 中等纤维的化学组成

细胞中大部分中等纤维的蛋白质的氨基酸顺序和分子结构已经弄清。它们共同的结构

图 6－26　培养细胞中的中等纤维照片
示上皮细胞中的角质纤维

是中央由一个约 310 个氨基酸残基、长度和序列上都非常保守的 α 螺旋杆状区组成，因而当它们组装在一起时，常常形成一种直径和内部结构相似的纤维。杆状区的两端是非螺旋的头部区（氨基端）和尾部区（羧基端），头尾区暴露在纤维的表面。它们参与和细胞质其他组分的相互作用。在不同的中等纤维间，它们的大小（相对分子质量）和氨基酸序列变化非常大。

中等纤维的成分较为复杂，不同细胞来源的中等纤维具有种属和组织特异性。根据免疫学性质和电泳行为，中等纤维可分为 3 大类，并且相当严格地分别分布在不同类型的细胞中：①角质蛋白（keratins）纤维，只在上皮细胞中表达；②波形蛋白（vimentin）和波形蛋白相关蛋白纤维在结缔组织细胞、肌肉细胞和神经系统中的支持细胞（神经胶质细胞）中表达；③神经蛋白纤维（neurofilaments）只在神经细胞中表达。此外，核纤层蛋白（lamins）虽然不形成胞质纤维，但从分子的结构和装配上看，也属于中等纤维一类。每一类中等纤维都由其相应的蛋白质亚单位聚合形成（图 6－27）。

6.3.2　中等纤维的组装

与微管和微丝相比，中等纤维的构造及装配更为复杂。中等纤维的亚单位是一种由一个 N 端的头部和一个 C 端的尾部以及中央杆状区组成的纤维蛋白（图 6－28A）。两个亚单位以其杆状区互相缠绕形成螺旋状的二聚体（图 6－28B）。两个二聚体再以非共价键相结合形成四聚体（图 6－28C）。四聚体再以端对端和侧对侧非共价结合在一起，最后形成绳索状的中等纤维（图 6－28D、E）。

中等纤维组装特点是遵从半分子长度交错的原则，四聚体中两个相邻超螺旋中的 α 螺

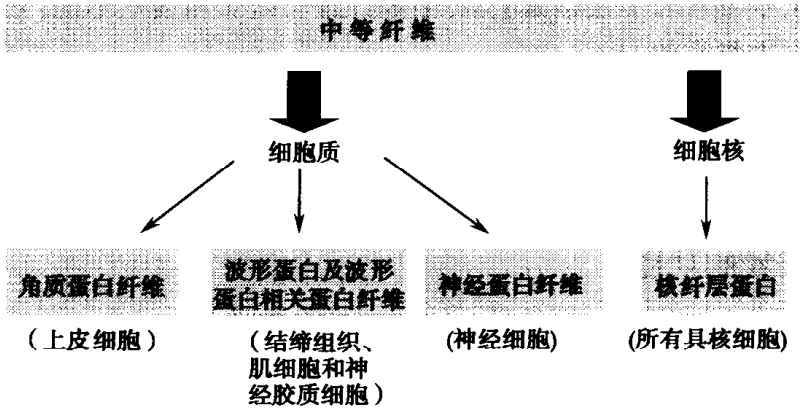


图 6－27 中等纤维的主要分类

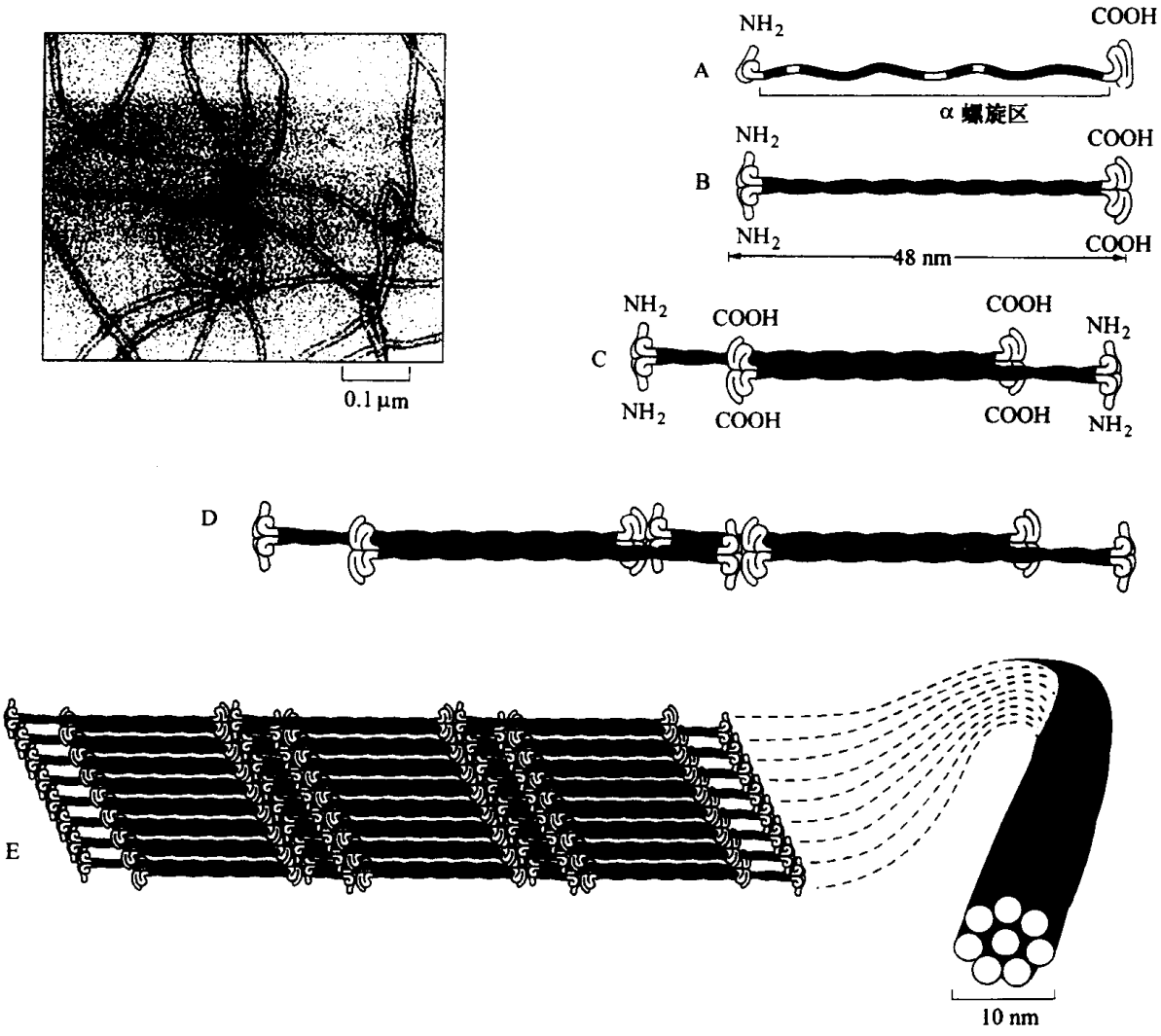


图 6－28 中等纤维的结构

A. 中等纤维单体是由中央杆状区和两端的球状区组成；B. 两个单体结合形成二聚体；C. 两个二聚体前后交错地排列成四聚体；D. 四聚体再以端对端地包装在一起(本图为清晰起见,示为扁平)；E.8 个四聚体扭成一绳索状的中等纤维。左上图显示 10 nm 中等纤维电镜照片(引自 B. Alberts, 等)

旋是反向平行的，这就解释了从整体上看，中等纤维与微管和微丝不同，它们的两端是对称的，即中等纤维是非极性的。

中等纤维在细胞内装配时也与微管和微丝有明显不同。后者都是只有 30% 左右处于装配状态，而中等纤维则绝大部分都装配成中等纤维，几乎不存在相应的可溶性的蛋白库，也没有踏车行为。

6.3.3　中等纤维的功能

中等纤维的功能至今仍是很不清楚，一个重要的原因是迄今尚未找到一种中等纤维特异的工具药。近年来的研究成果认为，中等纤维可能具有下列两方面的功能：

1．中等纤维对细胞的功能：从细胞水平来看，中等纤维在细胞内形成一个完整的支撑网架系统。它在外面与细胞膜和细胞外基质直接联系，在内部与核表面和核基质直接联系，中间与微管、微丝及其他细胞器联系，因此在细胞内和细胞间都起着多方面的结构作用。

中等纤维在提供细胞质的机械强度，特别是承受剪切力方面，显示有特别重要的作用。例如，它们在神经细胞的轴突中大量存在，使细胞轴突伸得很长并能增强其机械强度。它们在肌肉细胞和皮肤的上皮细胞中也特别丰富，其主要作用是使细胞能够承受较大的机械张力和剪切力。体外试验也证实中等纤维可以比微管、微丝耐受更高的剪切力，并承受较大的变形而不断裂(图 6－29)。这些功能的重要性可用一种人类罕见的遗传疾病——表皮水疱症(epidermolysis bullosa simplex)来进一步说明，当角质蛋白的基因发生突变，干扰角质蛋白纤维的形成时，结果，皮肤对机械伤害高度脆弱，只要稍加压力就能使细胞破裂，引起皮肤起水疱。

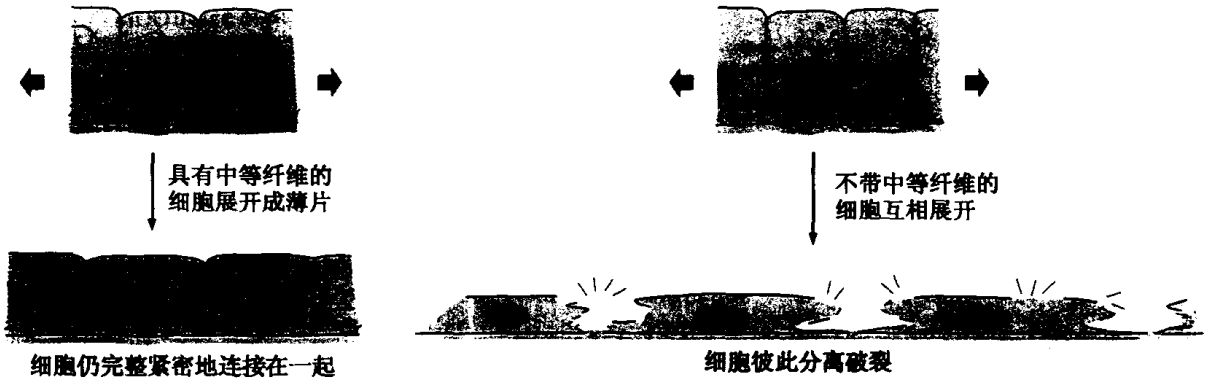


图 6－29　中等纤维增强动物细胞的强度

假如一片上皮细胞被外力展开(例如由于生长或周围组织的运动)，则由于中等纤维的网络和桥粒连接的存在可以增强其张力并限制展开的范围，如果没有中等纤维，则同样的力能引起细胞的严重损伤，甚至于引起质膜的崩溃

2．对细胞核的功能：胞质中等纤维呈绳索样，而在细胞核膜内侧面的中等纤维——核纤层蛋白以两维方向呈方格状衬着在核膜内表面形成核纤层(lamina)(图 6－30)。进入有丝分裂，当核膜碎裂时，核纤层蛋白去组装，当子细胞中核膜恢复时，重新组装成核纤层。核纤层蛋白的组装与去组装受磷酸化与去磷酸化调节。当磷酸化时，引起结构变化，削弱四聚体之间的联结，引起纤维崩解；有丝分裂末期，发生去磷酸化，引起核纤层蛋白的重新组装。

细胞骨架是一个复合的细胞结构系统，它的成分不是单独活动，而是不同成分在功能

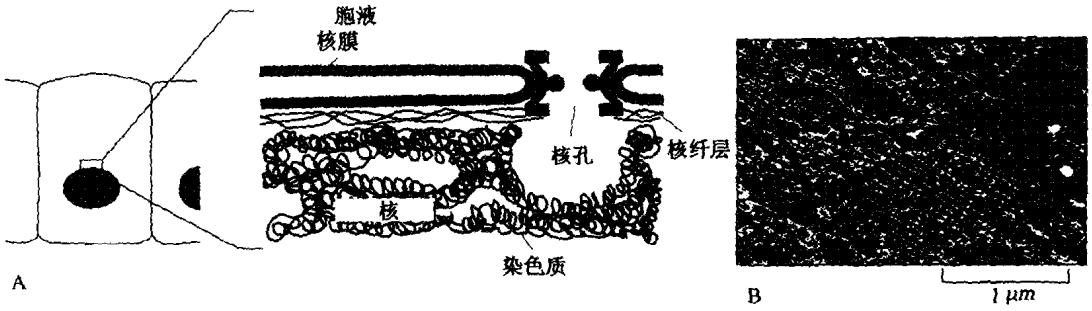


图 6－30　核膜下的核纤层

A. 核膜的横切面，示核纤层衬托在核膜内表面，并提供染色质粘着点；B. 蛙卵母细胞核纤层电镜照片，核纤层蛋白形成方的网格状(A 引自 B. Alberts, 等；B 引自 U. Aebi)

上高度精密地协调。例如，有丝分裂期的染色体运动主要与微管的组装和去组装有关，但也有学者发现，纺锤体中有肌动蛋白和肌球蛋白；在某些细胞中，中等纤维形成一个篮或球体围绕着纺锤体，说明染色体运动过程中不仅有微管而且也可能有微丝和中等纤维参与。有关染色体运动的分子基础说法尚不统一。

内容提要

细胞骨架是真核细胞内的蛋白质纤维组成的网架结构，包括微丝、微管和中等纤维，它们不仅对维持细胞形态、保持细胞内部结构的有序性起重要作用，而且还与细胞运动、物质运输、能量转换、信息传递、细胞分裂、免疫行为和细胞分化等生命活动密切相关。

微丝是指真核细胞中由肌动蛋白组成的，直径为 7 nm 的实心纤维。肌动蛋白相对分子质量为 4.3×10^4，呈球形，故称 G－肌动蛋白，它具有极性，组装时呈头尾相接，故微丝也称 F－肌动蛋白，同样也具极性。

肌动蛋白微丝的功能可被一些特异药物所扰乱——既可用细胞松弛素 B 阻止 F－肌动蛋白的聚合，也可用鬼笔环肽稳定 F－肌动蛋白，阻止去组装。

肌动蛋白微丝在微丝结合蛋白的协同下，可以形成多种不同的亚细胞结构，如应力纤维、肌肉肌原纤维、小肠微绒毛的轴心以及精子顶端的刺突等。这些结构的形成，以及它们的变化和功能状态，都在很大程度上受到不同的肌动蛋白的结合蛋白的调节。微丝的功能主要是参与肌肉收缩、细胞运动和细胞分裂等活动。

微管是由 α 微管蛋白和 β 微管蛋白异二聚体组装而成的长而挺直的中空蛋白质管，直径平均为 24 nm，和微丝一样也具极性。秋水仙素能特异性地破坏微管组装。微管的功能有：①构成细胞内的网状支架，维持细胞的形状；②细胞内物质运输；③纤毛和鞭毛运动；④纺锤体和染色体运动；⑤基体和中心体的移动等等。微管蛋白和动力蛋白相互作用是纤毛和鞭毛运动的基本机制。

中等纤维是一类结构上相似而组成上不同的、长而通常无分支的胞质纤维。它是一种坚韧而柔软的蛋白质纤维，其直径在 10 nm 左右，介于粗丝和细丝之间，故有时也被称为居间纤维。它的功能是构成细胞完整的支撑网架系统以及可能参与细胞核的信息功能。

思 考 题

1. 为什么说细胞骨架是细胞内的一种动态结构?
2. 在细胞骨架的研究中,特异性工具药起了什么作用?
3. 细胞骨架包括哪些类别? 各类的结构特征和主要化学成分是什么? 列表说明。
4. 什么叫微管组织中心(MTOC)? 有哪些结构可以起 MTOC 的作用?
5. 说明纤毛运动的机制。有什么证据说明动力蛋白是纤毛运动的动力来源之一?
6. 阐述肌肉(横纹肌)收缩运动的分子机理。
7. 试述为什么中等纤维上没有运动蛋白运动。
8. 试比较中等纤维和骨胳肌细胞中的肌球蛋白Ⅱ的结构,有哪些相似点,有哪些不同点,如何区分它们的结构和功能。
9. 在细胞骨架各种纤维中的结合蛋白有何重要作用?

参 考 资 料

1. 汪堃仁,薛绍白,柳惠图主编. 细胞生物学. 第 2 版. 北京:北京师范大学出版社, 1998. 226～299
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, *et al*. Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Publishing Inc, 1994. 788～858
3. Lodish H, Baltimore D, Berk A, *et al*. Molecular Cell Biology. New York: Scientific Ameriean Books, Inc, 1995. 991～1122
4. Bershadsky A D, Vasiliev J M. Cytoskeleton. New York: Plenum Press, 1988. 1～284
5. Amos L A, Amos W B. Molecules of the Cytoskeleton. London: Macmillan, 1991. 1～240
6. Hyams J S, Lloyd C W. Microtubules. New York: Wiley－Liss, 1994. 1～434
7. Wang E, Fischman D, Liem R K H. Intermediate Filaments. New York: The New York Academy of Sci, 1985
8. Alberts B, Bray D, Johnson A, *et al*. Essential Cell Biology. New York & London: Garland Publishing Inc, 1998. 513～545
9. Pollard T D. Genomics, The cytoskeleton and motility. Nature, 2001(409): 842～843

第7章

细胞核与染色体

细胞核中存在载有全部基因的染色体，它是遗传信息贮存场所，是细胞内基因复制和RNA转录中心，是细胞生命活动的调控中心，也是细胞中最大的细胞器。

细胞核的出现是生物进化过程中的一大飞跃。真核细胞和原核细胞最大的区别在于前者出现了核被膜(nuclear envelop)，从而将胞质与核质分开，形成了核与质两大结构与功能区域，DNA复制和RNA转录在核内，蛋白质合成则在胞质中进行。原核细胞不具核被膜，其DNA复制和RNA转录、蛋白质翻译都是在同一区间连续进行。

在真核细胞中，除了极少数特例如在哺乳动物成熟的红细胞和高等植物韧皮部成熟的筛管等以外，均含有细胞核。如果失去细胞核，一般说最终将会导致细胞死亡。细胞核形状大多为球形和卵圆形，随细胞类型不同表现出差异，如血液粒性白细胞的核为分叶状；蚕的丝腺核为分支状等；在许多纤毛虫中则有大核与小核。细胞核的大小也随生物不同表现出差异，高等动物细胞核直径一般为5～10 μm；高等植物细胞核直径一般为5～20 μm；低等真核细胞核较小，一般为1～4 μm。细胞核的体积约占细胞总体积的10%左右。

细胞核主要由核被膜、染色质、核仁及由非组蛋白组成的网络状的核基质组成

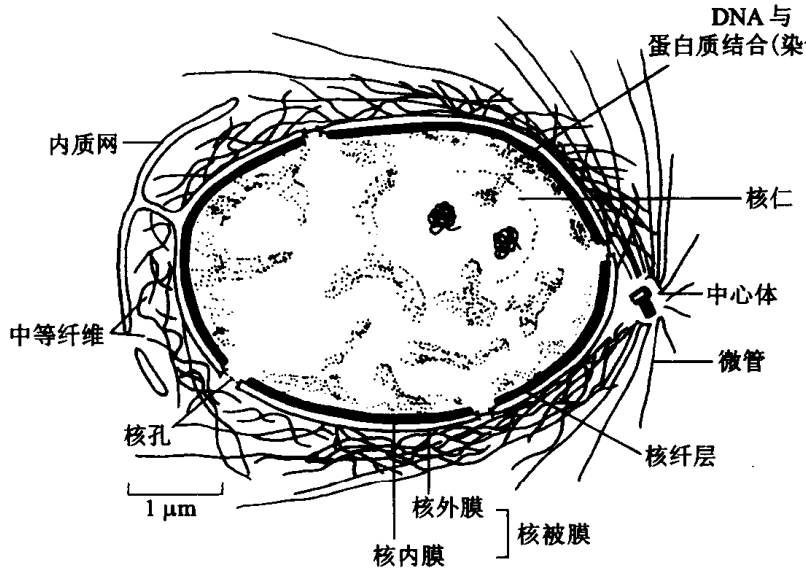


图7－1　一个典型的细胞核横切面示意图

核被膜由两层膜组成，核外膜与内质网膜相连续，核外膜与核内膜的脂双层在每个核孔处连接；中等纤维网络为核被膜提供机械支持，核内侧的中等纤维构成片状的核纤层(引自B. Alberts)

(图 7－1)。这些成分相互联系和依存,使细胞核作为一个统一的整体发挥其重要的生理功能。

7.1 核被膜与核孔复合物

随着生物技术研究的进展,特别是电子显微镜技术的运用,对核被膜的精细结构也有了进一步的阐明。

7.1.1 核被膜与核孔复合物的结构

核被膜由内、外两层单位膜组成(图 7－2)。每层单位膜的厚度约为 7.5 nm。面向胞质的一层为核外膜(outer nuclear membrane),其表面附有大量的核糖体颗粒,常见与糙面内质网膜相连续。核内膜(inner nuclear membrane)面向核质,表面光滑没有核糖体颗粒,但与浓集的染色质紧密接触。核内膜上有特定蛋白质如核纤层蛋白 B(lamin B)受体等,因而为核纤层(lamina)提供了结合位点,将核膜能固着在核纤层上。在核内、外膜之间有宽 20～40 nm 腔隙,称为膜间隙(intermembrane space),是与内质网腔连通的。在核被膜上有排列规律的核孔(nuclear pore),核孔是内、外两层膜的局部融合之处形成的环状开口,它是核质与胞质物质相互交流的渠道,并有一定的选择性,在电镜下显示出具有复杂的、有规律性的结构。核孔的直径约为 80～120 nm,每个核孔由具精细结构的核孔复合物(nuclear pore complex, NPC)组成。核孔复合物镶嵌在核膜上。迄今已知在所有真核细胞,从酵母到人,在间期细胞核中均普遍存在核孔复合物,但随不同类型细胞及细胞核的不同转录活性,核孔的数目差异较大。如哺乳类细胞约 11 个/μm^2,核孔总数为 3 000～4 000 个,但在非洲爪蟾卵母细胞(转录活跃)核孔数可高达 60 个/μm^2,其总数可高达 3 000 万个左右。

关于核孔复合物的精细结构,长期以来一直是细胞生物学形态结构功能研究的重点之一,多年来相继推出一些模型进行描述。在近年来推出的核孔复合物新的结构模型中,综合起来,该复合物是由环、辐、栓等结构亚单位组成(图 7－3)。主要有下列结构组分:①胞质环(cytoplasmic ring),位于核孔边缘的胞质面一侧(又称外环),在环上有 8 条纤维伸向胞质;②核质环(nuclear ring),位于核孔边缘的核质面(又称内环),环上也连有 8 条纤维伸向核内,并且在纤维末端形成一个小环,使核质环形成类似"捕鱼笼"(fish－trap)的核篮(nuclear basket)结构;③辐(spoke),由核孔边缘伸向核孔中央,呈辐射状八重对称,该结构连接内、外环并在发挥支撑及形成核质交换通道等方面起作用;④中心栓(central plug),位于核孔的中心,鉴于其可能在核质交换中起一定作用,故也被称为转运器(transporter)。现已知参与核孔复合物组成的蛋白约有 100 多种,如核孔蛋白(nucleoporin)中 gp210 蛋白是一种定位于核孔的跨膜糖蛋白,其作用是将核孔复合物锚定在孔膜上,对稳定核孔复合物的结构有重要作用。此外,它可能在内、外核膜融合构成核孔及在核质物质交换中起一定作用。又如核孔蛋白中的其他一些糖蛋白 p62 等,也多参与核质物质交换,在维持核孔复合物的功能中发挥作用。

7.1.2 核孔复合物的功能——核质分子双向选择性交换通道

核孔是核质与胞质之间分子及颗粒双向交换的重要通道。核孔复合物在功能上可被认

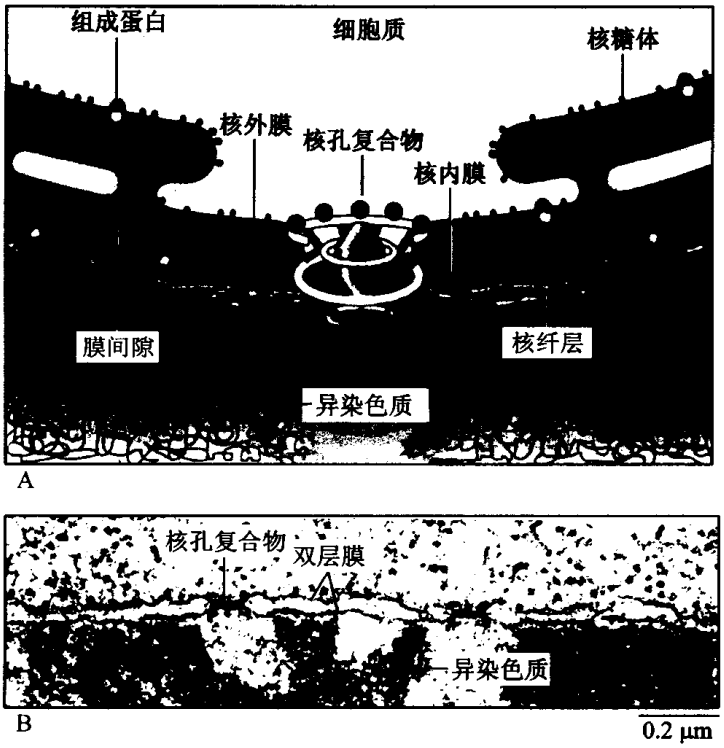


图 7-2 核被膜

A. 图解示核被膜双层膜、核孔复合物、核纤层和连有糙面内质网的核外膜；B. 洋葱根尖细胞部分核被膜切片电镜图，示双层膜、核孔复合物和相连的异染色质

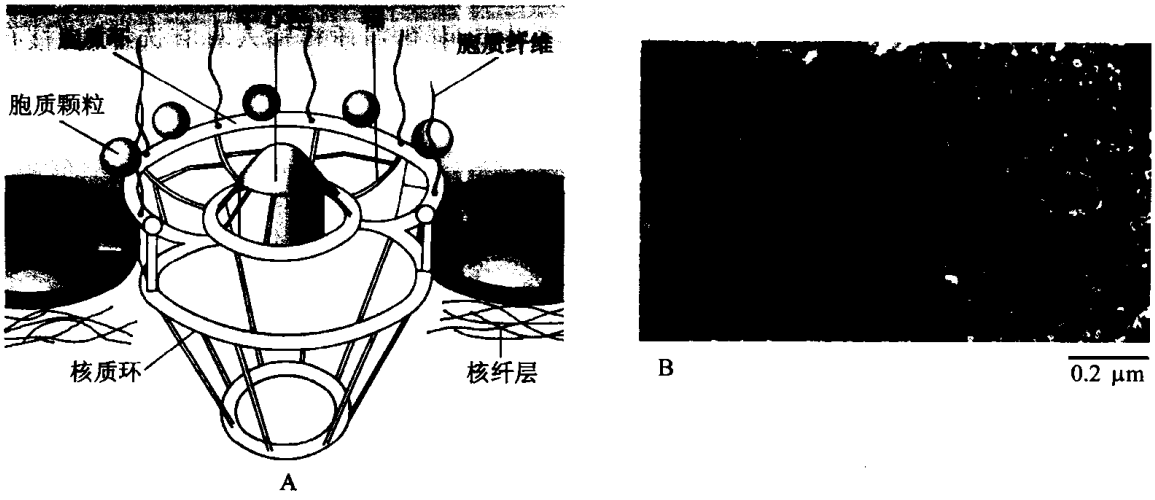


图 7-3 核孔复合物结构图示

A. 核被膜中核孔复合物立体结构模型；B. 电镜图示分离的两栖类卵母细胞核被膜细胞质面核孔复合物边缘的胞质颗粒(仿 G. Karp, 1999)

为是一种特殊的跨膜运输蛋白复合物，构成了核质间双向运输的亲水通道。核孔复合物的通道是一条充满液体的、直径 9 nm、长约 15 nm 的柱状孔道，使水溶性分子穿梭运动于核质与胞质之间，但分子通过跨膜运输进行交换是具有选择性的。通过实验表明，相对分子质量小的分子(小于 5×10^3)注射于细胞质中，可自由扩散通过核被膜，相对分子质量为 1.7×10^4 的蛋白质在 2 min 内可达到核质间的平衡，相对分子质量为 4.4×10^4 的蛋白质要经过 30 min 达到平衡，而相对分子质量大于 6.0×10^4 的球蛋白几乎不能进入核内，即不能经过自由扩散通过核孔。如直径约为 30 nm 的细胞质核糖体，它们不能经自由扩散通过核孔，

从而保证了所有蛋白质合成局限在细胞质中进行。核孔复合物在维持细胞核的功能及细胞核与细胞质中不同蛋白质的需求与供给中起重要作用。正如前述，一个典型的哺乳类细胞，核被膜上有 3 000～4 000 个核孔，如细胞正在合成 DNA，必须每 3 min 从细胞质运输入细胞核 10^6 个组蛋白分子；将 DNA 组装为核小体，平均每分钟核孔要运入 100 个组蛋白分子进入细胞核；如果生长迅速时，则每个核孔将运出新组装成的核蛋白体大小亚基进入细胞质中装配，以确保蛋白质合成的需要。已知细胞核内是 DNA 和 RNA 合成及核蛋白体亚单位合成和组装的场所，核蛋白体亚单位等大分子必须从细胞核输出；而在细胞质中合成的相对分子质量至少有 1.0×10^5～2.0×10^5 的 DNA 和 RNA 聚合酶等大分子，必须从细胞质中输入细胞核。细胞核如何输入及输出这些大分子？实验表明，大分子的核质分配主要是通过核孔复合物的主动运输完成的，它具有双向性和高度选择性。通过核孔复合物的主动运输是一个信号识别与载体介导的过程，并且需要有能量供应。如一些在细胞质中合成后被输入到核内发挥功能作用的亲核蛋白(karyophilic proteins)向核内运输时，核孔复合物对它们是有选择性的。核质蛋白(nucleoplasmin)是一种丰富的亲核蛋白质，它具有明确的头、尾结构域，用蛋白水解酶进行有限水解，可将其头尾分开。如将带有放射性标记的完整核质蛋白及其头、尾部片段分别注入到爪蟾卵母细胞的细胞质中，结果显示，相对分子质量很大的完整核质蛋白不能进行被动扩散，但却能在核内迅速积累，注入尾部也可进入核内，但注入头部片段却被排斥于核外。实验表明该种蛋白尾部结构中存在亲核的输入信号。将核质蛋白及其头尾结构域分别包裹在 20 nm 的胶体金颗粒上，再注入细胞质，通过电镜观察，也证实了核质蛋白和尾部片段均能在核内积累。实验结果表明，蛋白质核输入具有选择性，核孔复合物的有效通道大小是可被调节的(图 7－4)。

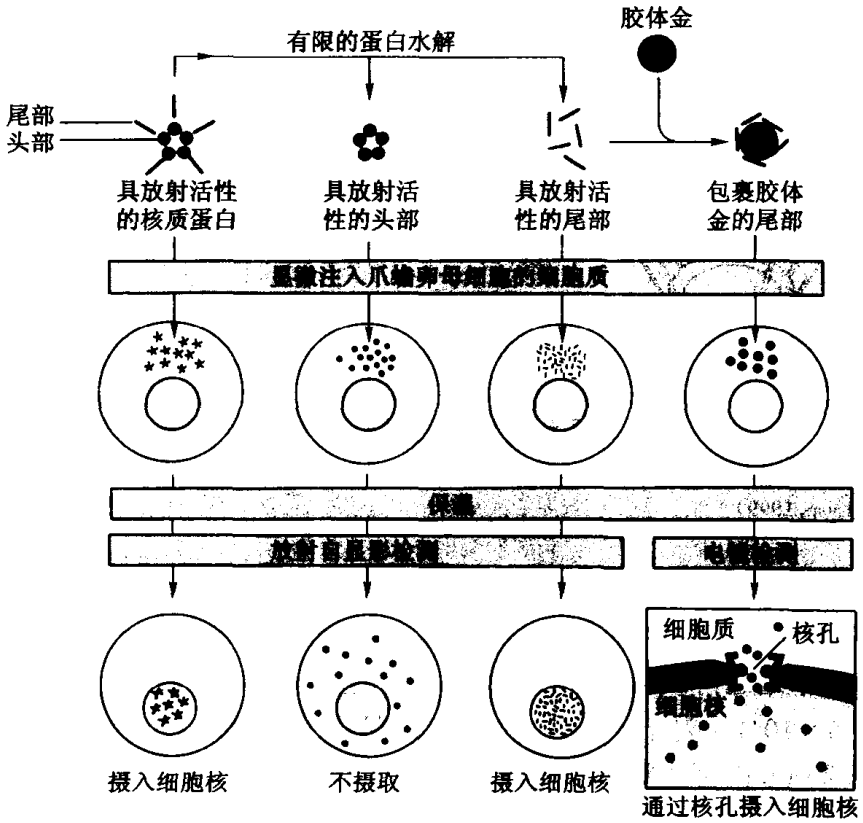


图 7－4　通过核孔复合物选择性输入蛋白质示意图

对核孔复合物主动运输的亲核蛋白的进一步分析发现，亲核蛋白一般都含有一段特殊的氨基酸序列，称为核定位信号(nuclear localization signal, NLS)。第一个被确定 NLS 序列的蛋白是 SV40 的 T 抗原，在宿主细胞核中为复制病毒 DNA 所必需，它在胞质中合成后很快积累在核中。野生型的 NLS 氨基酸序列为 Pro－Pro－Lys－Lys－Lys－Arg－Lys－Val，当其中 1 个氨基酸发生突变成为 Pro－Pro－Lys－Thr－Lys－Arg－Lys－Val 时，则阻断了 T 抗原向核内的转移，经免疫荧光技术检测，可见后者细胞核内无荧光，表明 T 抗原保留在细胞质中(图 7－5)。如果将野生型 NLS 连接到非亲核蛋白随机选择的 Lys 侧链上，此非亲核蛋白质也能转移到核内。以后又发现一些其他亲核蛋白的 NLS 序列。通过研究表明，NLS 是由 4～8 个氨基酸短肽组成，富含正电荷的 Lys、Arg 及 Pro。在不同的 NLS 之间尚未发现共有的特征序列。NLS 序列可定位在亲核蛋白的不同部位，而且与输入其他细胞器的信号肽或导肽不同，NLS 序列进入核内后并不被切除。

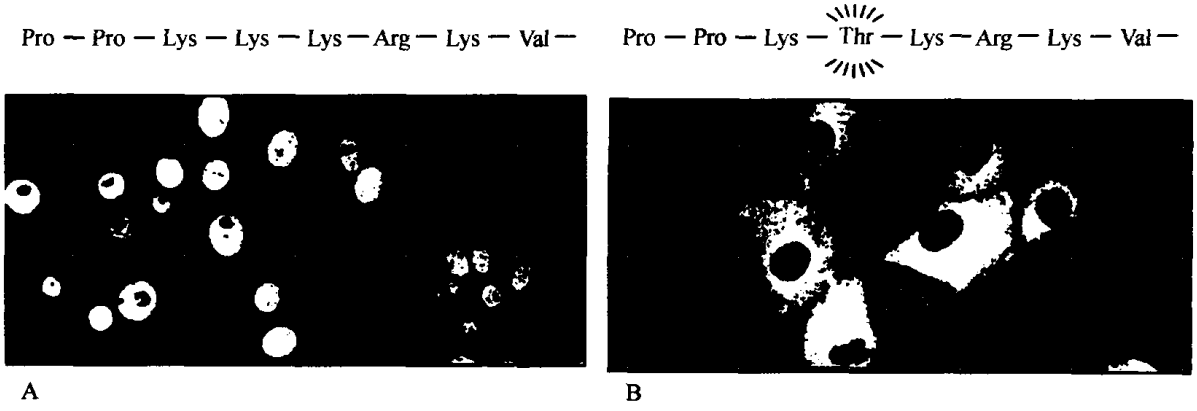


图 7－5 免疫荧光法显示含有或缺少作为核定位信号的短肽的 SV40 病毒 T 抗原的细胞定位
A. 野生型 T 抗原蛋白含有赖氨酸(Lys)丰富的序列，它可被输入核内的作用位点；B. 当 T 抗原蛋白带有一个改变的核定位信号时，即苏氨酸(Thr)代替赖氨酸(Lys)，则 T 抗原保留在细胞质中

近年来研究表明，带有 NLS 序列的亲核蛋白进入细胞核分为几个不同阶段。已知细胞质中存在 NLS 受体(又称 importin)，是个异源二聚体(importin α/β)。实验表明，亲核蛋白首先通过 NLS 序列与细胞质中 NLS 受体结合形成复合物，该复合物与核孔复合物的胞质纤维结合；继之，移位至核孔复合物中央，通过核孔复合物中心栓构象的变化，使转运器中央通道打开，允许该复合物进入核质中，与核质中存在的一种 GTP 结合蛋白(Ran)相互作用，引起该复合物的解离，在此过程中，亲核蛋白被转运入核质中，而 NLS 受体亚单位和 Ran 蛋白穿梭返回细胞质中，被解离的受体亚单位重新被利用(图 7－6)。经水解后形成的 Ran－GDP 又被返回细胞核中转换为 Ran－GTP，也重新被利用(图 7－6 中未显示)。

与核输入类似，核蛋白体亚基和 mRNA 分子通过核孔复合物输出也是一种具有高度选择性的信号指导过程。如将 tRNA 或 5S rRNA 包裹的 20 nm 胶体金颗粒显微注入至蛙卵母细胞核中时，它们能迅速通过核孔进入细胞质中；但如果将它们注入蛙卵母细胞的细胞质中，它们就被保留在细胞质内。因此核孔复合物中也同时含有识别指导细胞核中 RNA 或蛋白质输出至细胞质的信号或受体。如通过实验表明，5′端 m^7G 帽子结构的功能对于 mRNA 及 U1 snRNA 的核输出是关键信号；又如 mRNA 前体 hnRNP 局限在细胞核内，它

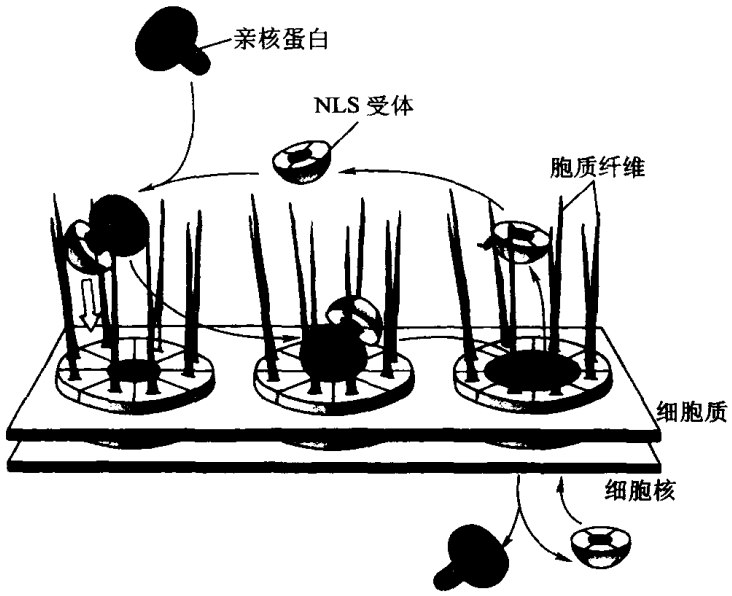


图 7－6　亲核蛋白通过核孔复合物活化转运机制示意图

首先，存在于细胞质中被称为 NLS 受体的蛋白与亲核蛋白的核定位信号(NLS)结合，该复合物与核孔复合物伸出的胞质纤维结合并移至核孔复合物中央，伴随着中心栓构象的变化，使中心栓中央通道打开，亲核蛋白与其结合的受体复合物转运至核质中与一种 GTP 结合蛋白(Ran)相互作用(未显示)，引起该复合物的解离，亲核蛋白被转运入核质中，而 NLS 受体亚单位和 Ran 蛋白穿梭返回细胞质中，被解离的 NLS 受体亚单位在细胞质中重新被利用(引自 B. Alberts, 1998)

们必须经过剪切加工，与蛋白质结合后才被输出细胞核。有人认为可能在这些复合物的蛋白质亚基中包含有核输出信号(nuclear export signals, NES)。因此 RNA 分子与核蛋白体亚单位等分子通过核孔复合物进行核输出也是一种由受体介导的信号识别的主动运输过程。

7.1.3　核纤层的结构与功能

核纤层(nuclear lamina)是位于细胞核内膜与染色质之间的纤维蛋白片层或纤维网络，与核内膜紧密结合。在不同细胞中，其厚度变化较大，一般厚约 10～20 nm(有的可达 30～100 nm)。核纤层纤维纵横排列整齐，呈正交状编织成网络(图 7－7)，整体观呈球状或笼状网络，切面观为片层结构。它普遍存在于高等真核细胞间期细胞核中。

核纤层由核纤层蛋白(lamin)构成，在脊椎动物中，构成核纤层的中间纤维蛋白有 3 种，即核纤层蛋白 A、B、C，相对分子质量在 6.0×10^4～8.0×10^4 之间，核纤层蛋白在序列上有很高的同源性。Gerace 等(1984)分析大鼠肝核被膜，发现核纤层蛋白 B 与核纤层蛋白 A、C 相比，具有与核被膜更强烈的相互作用，很可能核纤层蛋白 B 在连接核纤层到核内膜上更为重要。核纤层在结构上与核被膜、染色质及核孔复合物均有密切联系。核纤层的外层与包埋在核内膜的脂双分子层的特殊蛋白质相结合，而核纤层的面向染色质的一面和染色质上的一些特殊位点相结合(图 7－2)。一般认为核纤层为核被膜及染色质提供了结构支架，它与维持核孔的位置和核被膜的形状密切有关，并介导核被膜与染色质之间的相互作用。核纤层在细胞有丝分裂中和核被膜的崩解和重组密切相关。Gerace 等认为分裂期细胞中核纤层的可逆性解聚与重装配对核被膜的崩解与重新装配具有调节作用。核纤层蛋白的磷酸化与去磷酸化可能是分裂期中核纤层结构动态变化的调控因素。当细胞进行有丝分裂时，核纤层蛋白被磷酸化，引起核纤层可逆性解聚和去组装，为核被膜崩解形成核膜囊泡提供了必要的微环境。分裂期中核纤层蛋白 B 结合在核膜囊泡上，在有丝分裂末期，核纤层蛋白去磷酸化进行重新装配直接介导了核被膜围绕染色体的重新装配并经膜融合后形成新膜(详见第 8 章细胞增殖及其调控)。

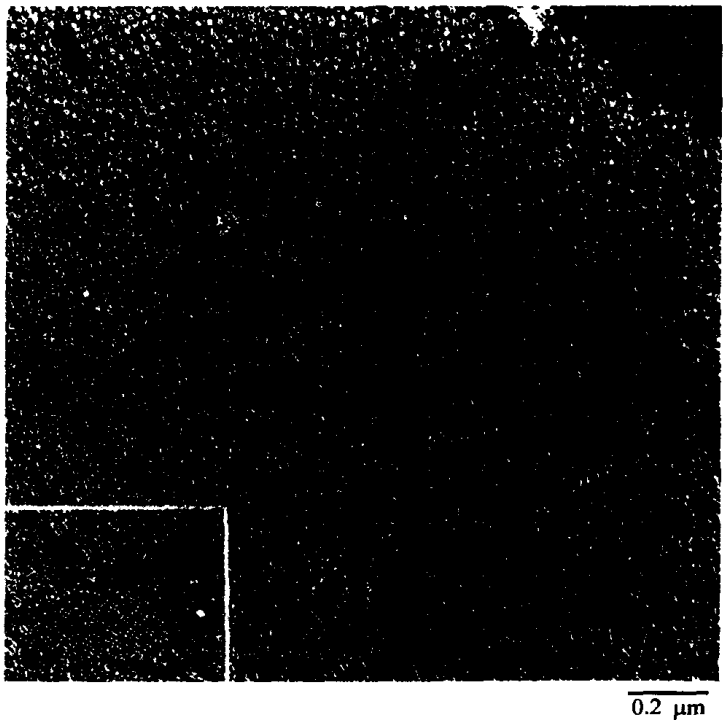


图 7-7 核纤层结构电镜照片

一个非洲爪蟾卵母细胞核被膜经 Triton X-100 处理去膜的冰冻干燥金属投影电镜照片，插图显示核孔已被去除区域核纤层纤维交织成网状

7.2 染 色 质

早在 1879 年 W. Flemming 将细胞核中能被碱性染料染色的物质称为染色质(chromatin)。后来，1888 年 W. Waldeyer 提出了染色体(chromosome)的命名。染色质、染色体是遗传信息的载体，历经一个多世纪的研究，对其已有了相当深入的认识。染色质存在于间期核内，为极细的丝状物，常称为染色质纤维(chromatin fiber)。在细胞分裂期由染色质纤维包装形成光镜下可见的染色体。因此染色质和染色体是在细胞周期的不同阶段存在的不同形态，也可以说染色质是间期核存在的染色体。在细胞周期中它们的形态结构能够互相转变，说明它们处于不同的功能阶段，在活细胞内绝大部分时间是以染色质的形态存在。每个物种的细胞都有一定数目的染色体。在细胞内一套形态大小各不相同、协调工作的染色体(即单倍染色体组)及其上的全部基因(gene)，称为染色体组或基因组(genome)。

7.2.1 染色质 DNA

已经实验证明，真核生物染色质的主要成分是 DNA、组蛋白、非组蛋白及少量 RNA。DNA 与组蛋白含量之比接近于 1:1(1.3:1.1)，在所有组织是相对恒定的，是细胞内稳定的结构成分；非组蛋白的量变化很大，与 DNA 的比率为 0.2:1～0.8:1；RNA 与 DNA 之比为 0.1:1。非组蛋白量、RNA 量的变化均与细胞代谢活性相关，代谢活性越高，非组蛋白、RNA 的比率越大，同时，它们也随细胞周期而变化。

所有生物的遗传物质都是 DNA(仅少数病毒例外,为 RNA)。每条染色体(指未复制的)含有一个 DNA 分子,在 DNA 的核苷酸序列中寓有大量的遗传信息。由于 4 种核苷酸千变万化的排列顺序构成了 DNA 分子的多样性,显示出物种的多样性。真核细胞的 DNA 含量远远大于原核细胞的。但是基因组的大小与生物有机体的复杂性不是完全相关。在生物界存在有"C 值矛盾现象(C - value paradox)"。所谓 C 值是指物种单倍体基因组 DNA 的总量。一般真核生物的 C 值随生物进化而增加,高等生物的 C 值一般大于低等生物的,但是某些两栖类的 C 值比哺乳类的还大。有些两栖类、植物细胞 DNA 含量比人细胞的 DNA 多 30 倍以上,这一现象曾长期令人迷惑,随着人们对基因组含有大量重复序列的认识不断加深,逐步有所解决。

7.2.1.1 DNA 序列

DNA 序列大体上分为单一序列(unique sequence,也称为非重复序列)和重复序列(repetitive sequence),前者在基因组内一般只有一个拷贝,编码蛋白的基因、原核细胞的基因为单一序列;后者在基因组内具有许多拷贝,并具多种形式的重复序列。

人类基因组测序及其用以对比的几种模型生物——酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),线虫(*Caenorhabditis elegans*),果蝇(*Drosophila melanogaster*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组的序列分析(2001 年 2 月发表),对基因组 DNA 序列提供了更具说服力更深层的认识,解决了许多问题,又出现了一些新的奥秘。例如,人类基因组由 32 亿(31.647 亿)bp 组成,其中编码蛋白的基因有 3~4 万个(有 2.638 3 万个数据充足,1.273 1 万个证据较弱)。远远小于原先估计的 10 万个基因,这仅约为线虫、果蝇的 2 倍。在人类基因组中存在大量的 DNA 重复序列,至少占基因组的 50%,可能更多;而且编码蛋白的 DNA 序列大多被不编码的重复序列所分隔,有大段的没有基因的重复序列。大部分基因很像存在于上百万碱基对的重复序列所分隔的孤岛。基因的密度在不同的染色体不一样:在 17、19、22 号染色体上密度最大;在 4、18 号、X 和 Y 染色体上相对贫瘠。地球上人与人之间有 99.99% 的基因密码是相同的。基因(或至少是编码区)仅为 DNA 的一细小片段,但它们代表基因组的主要生物学功能,是生物学者们长期主要关注的部分,也是人类基因组中最难以鉴定的。

1. 基因组中的基因

按人类基因组图谱介绍的,在基因组中的基因分为编码蛋白基因和非编码 RNA 基因。

(1)编码蛋白基因(protein - coding gene):人类基因的大小和内含子的大小变化较大。许多基因长度在 100 kb 以上,最大的已知的例子是 dystrophin 基因(DMD)为 2.4 Mb。编码序列、外显子的大小分布变化不是很大,虽也有例外,如 tintin 基因有一最长的编码序列(80 780 bp);最多数目的外显子(178)、和单个很长的外显子(17 106 bp)。典型的编码序列在各物种很相似(线虫为 1 311 bp,果蝇 1 497 bp,人类 1 340 bp),证实了外显子大小具有保守性。令人感兴趣的是极少数短的人类外显子的不平常的碱基组成,检测 42 个外显子不到 19 bp,核苷酸序列 A、G、T、C 量分别为 39%、33%、15% 和 12%,说明这富含嘌呤的序列适应增强剪接的需要。内含子的大小分布在 3 个物种间有本质不同,线虫、果蝇均为适宜密集分布,大部分内含子长度在线虫为 47 bp,在果蝇为 59 bp(加上伸长的尾部全部平均长度在线虫为 267 bp,在果蝇为 487 bp),而人类内含子大小变化很大,峰值 87 bp,有很长的尾部,导致平均为 3 300 bp 以上。内含子大小变化影响基因大小的变化。富含 GC 区域倾向于基因密集,富含 AT 区域倾向于基因贫乏。分析了 53 295 个内含子,98.12% 二核苷酸 GT 在

5′剪接位点和 AG 在 3′剪接位点，证实了 GT－AG 型的保守性和存在的广泛性。同时注意到人类基因的选择拼接(alternative splicing)，能使许多蛋白质从一单个基因中产生，并用于复杂的基因调节，最低估计人类基因组约 35％基因进行选择拼接。为了研究其普遍性，分析了 19 号和 22 号染色体上基因的整个编码区，重建了 mRNA 转录物(略去编码区小于 240 bp 的小基因)。结果 19 号染色体 544 个基因有 1 859 个转录物，平均每个基因有 3.2 个不同的转录物；22 号染色体，平均每个基因有 2.6 个转录物，其中 145 个基因(占 59％)有 2 个或更多的选择拼接转录物。人类基因组的基因数目虽仅为线虫、果蝇、植物的 2 倍，但人类比其他物种具有更高级的高水平的选择拼接。换言之，基因的蛋白编码区段(外显子)常常有多种方式能被连接在一起，产生功能上的 mRNA 分子，翻译成蛋白质。因此人类比其他物种每个基因可编码更多的蛋白质。

(2)非编码 RNA 基因(noncoding RNA gene)：人类有几千个基因产生非编码 RNA(ncRNA)为其最终产物。主要的 ncRNA 基因有几类：①tRNA 基因，在人类基因组序列中仅发现 497 个 tRNA 基因(加上有关的假基因为 821 个，远小于过去估计的 1 310 个)，散在于整个人类基因组中，但其分散是非随机的，有时小范围聚集或明显地大范围聚集存在，如 25％以上的 tRNA 基因(140 个)存在于 6 号染色体约 4 Mb 区域内(约占基因组的 0.1％)；②rRNA 基因，最近经 X 射线结晶衍射研究，表明肽键的合成不是由于蛋白质而是由于 rRNA 催化的。rRNA 有大、小 2 个亚基(large subunit, LSU；small subunit, SSU)，LSU、SSU rRNA 基因在人类基因组中为 44 kb 串联重复单位，约 150～200 个拷贝排列在近端染色体(13、14、15、21 和 22 号染色体)短臂，5S rDNA 基因也是串联重复排列，最大的是在 1 号染色体 $1q^{41.11}$和 $1q^{42.13}$之间靠近端粒；③小的核仁 RNA(small nucleolar RNA, snoRNA)基因，真核 rRNA 在核仁内被广泛地加工和修饰，这种作用活性大部分来自许多 snoRNA。已经研究了一组 97 个已知的人类 snoRNA 基因序列，其中 84 个(87％)在基因组序列中至少有一个拷贝，几乎所有的都是单一拷贝基因；④小的核 RNA(small nuclear RNA, snRNA)基因，snRNA 是剪接体(spliceosome)的关键成分，是核糖核蛋白(RNP)复合物，在核内它剪除 pre－mRNA 的内含子。已发现至少 22 个已知的 ncRNA 基因中，21 个(95％)是一个拷贝，包括剪接体 snRNA，有一些 ncRNA 是多拷贝的(如 U6 snRNA 44 个分散的基因)。这些 RNA 基因有些是同质多基因家族(homogeneous multigene families)串联重复排列或其他排列方式。

2. 基因组中的重复序列

可分为 5 类。

(1)转座子来源的重复序列(transposon－derived repeats)：所谓转座子是指在基因组中那些能自我复制又能移位将一个拷贝插入新位点的 DNA 序列单位。大部分人类的重复序列来源于转座因子(transposable elements)。现在能识别基因组约 45％属于这一类。人类基因组充满了古老的转座子而其他生物倾向于更新近的来源。哺乳动物几乎所有转座因子都归于以下 4 种类型之一：①长散在重复元件(long interspersed elements, LINEs)，序列较长，约 6～8 kb，约有 85 万个拷贝，占基因组的 21％，其中 LINE 1 和 Alu 两个重复家族占所有散在重复序列的 60％；②短散在重复元件(short interspersed elements, SINEs)，序列较短，100～400 bp，约有 150 万个拷贝，占基因组的 13％；③LTR－反转座子(LTR－retroposon)，它是一类长端部(long terminal repeats, LTR)的转座因子，反转座子与转座子最大不同点是

它需由 RNA 介导转移位置，因其性质不同分为两大类、序列长度不同：6～11 kb，1.5～13 kb，二者拷贝数约为 45 万，占基因组的 8%。它包含所有必需的转录调节因子；④DNA 转座子(DNA transposon)，序列长度为 2～3 kb，包括古老的类型约 30 万个拷贝，占基因组的 3%。人类基因组至少有 7 类主要的 DNA 转座子，能再分为许多具独立来源的家族。在人类基因组常染色质部分比其他几种生物有很高密度的转座因子拷贝。过去认为 LINEs、SINEs 等均属于中度重复序列(拷贝数 10～10 万)，现在按拷贝数应属于高度重复序列(拷贝数在 10 万以上)，但它又与原来认为的高度重复序列的串联重复不同，这类重复序列对基因的调控、基因组的变异以及物种进化起重要作用。

(2)细胞基因(包括编码蛋白基因和小的结构 RNA)无活性的(部分的)反转座拷贝：常指那些加工的假基因(pseudogene)。

(3)简单序列重复(simple sequence repeats，SSRs)：与前已述及的单一序列不同，它是相当短的序列重复，如$(A)_n$、$(CA)_n$ 或$(CGA)_n$ 完全或稍不完全的串联重复。较短的重复单位($n=1$～13 碱基)，常称为微卫星(microsatellites) DNA；较长的重复单位($n=14$～500 碱基)常称为小卫星(minisatellite)DNA。SSRs 占人类基因组约 3%，大约每 2 kb 有一个 SSR，最大频率的二核苷酸重复是 AC 和 AT(分别占二核苷酸重复的 50% 和 35%)；最大频率的三核苷酸是 AAT 和 AAC 重复(分别为 33% 和 21%)，而 ACC(4%)、AGC(2.2%)、ACT(1.4%)、ACG(0.1%)都相对很少。三核苷酸的 SSRs 比二核苷酸的少得多。SSRs 对人类遗传研究相当重要，因为它们在人类群体中表现有高度的长度多态性。根据在 SSRs 上的遗传标记——特别是$(CA)_n$ 重复，已用于大部分人类疾病图谱的研究。用小卫星 DNA 探针与总 DNA 限制酶切片段杂交，可获得具个体特异性的指纹图，此种 DNA 指纹(DNA fingerprinting)技术早已用于亲子鉴定谱系分析等方面。

(4)节段复制(segmental duplications)：是人类基因组的一个显著特征，即基因组序列的一些节段复制，复制的节段约 1～300 kb，转移到基因组的一个或多个位点。基因组供体和接受区域的位置，常常不是串联排列的，两种的外显子和内含子序列的一致性很强，因此认为它们是在很近的进化时间内产生的(古老的复制区域仅编码区相似)。节段复制可分为两种类型：

①染色体间的复制(interchromosome duplication)，是指在非同源染色体之间复制的节段。例如，21 号、22 号染色体在接近着丝粒的区域，几乎完全由染色体间的复制节段所组成，极少或无单一序列，在接近端粒也有一较小区域的染色体间复制，22 号染色体在邻接着丝粒 1.5 Mb 区域内，其中 90% 序列能被识别是由染色体间复制组成，在 22 号染色体上染色体间复制的 52% 是位于这个区域，亚端粒的端部 50 kb 的区域几乎全部由染色体间复制组成；21 号染色体在着丝粒之后第 1 个 1 Mb 和亚端粒区域(30 kb)是由染色体间复制组成。肾上腺脑白质营养不良(adrenoleukodystrophy)座位 9.5 kb 序列节段是从染色体 Xq^{28} 被复制到染色体 2、10、16 和 22 号接近着丝粒的区域。经观察指出，许多染色体间复制在人类染色体是靠近着丝粒区和端粒区。靠近或接近着丝粒的区域特称为着丝粒周区(pericentromeric region)，靠近或接近端粒的区域特称为亚端粒区(subtelomeric region)。

着丝粒周区的结构很复杂，如 21 号染色体，显示有连续地逐次地复制节段的插入。明显的插入，典型的是被富含 AT 或富含 GC 小卫星样的重复序列所分开。已假定它有标示复制物到这些区域的功能。

②染色体内复制(intrachromosome duplication),发生在特定的染色体和染色体臂之内,包括几种复制节段。已知低拷贝的重复序列,它介导经常发生的与遗传疾病相结合的染色体结构重排。例如,17 号染色体包含约 200 kb 重复的 3 个拷贝被约 5 Mb 分开以及约 24 kb 重复的 2 个拷贝被 1.5 Mb 分开。这些拷贝是那么相似(99%一致),以致能发生异常(paralogous)重组事件,引起邻接基因综合症:分别为 Smith - Magenis 综合症和 Charcot - Marie - Tooth 肌萎缩综合症 1A。

(5)串联重复序列区段(block of tandemly repeated sequence):存在于染色体的着丝粒、端粒、近端着丝粒染色体的短臂和核蛋白体基因簇(详见染色体部分)。

3. 单核苷酸多态性

除了上述的 DNA 重复序列外,在人类基因组序列中还发现了基因序列的变异——单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNPs),它表现为人与人个体之间的差异。我们自身携带的 2 个基因组各来自于双亲的遗传,它们常在单个碱基组成上彼此不同,也与其他人不同,这一般是无害的。国际 SNP 图谱工作组描述了 142 万个分布在全人类基因组的中 SNPs,提出平均密度为每 1.9 kb 有 1 个 SNP。估算在人类基因组内有 6 万个 SNPs("编码"的 SNP),而且经分析确定 93%的基因至少有一个 SNP,其中有 59%的基因有 5 个或更多的 SNPs,39%的基因有 10 个或更多。大部分人类的序列变异可归因于 SNPs,通过基因影响到大部分人类的变异都能追溯到 SNPs(其余可归因于碱基的插入和缺失、重复长度多态性或重排)。几乎每个人的基因和基因组区域都有序列变异的标记 SNPs,它发生突变的频率很低,因此它又是人类历史稳定的指示物。现已建立了人类基因组 SNP 图谱,它是一个前所未有的工具,用来研究人类基因组序列变异的特征,对人类医学和群体遗传学的发展起着极大的推动作用。现已鉴定出几百种疾病基因;已知单个碱基在 APDE 基因的差异是和 Alzheimer's 病(早老性痴呆病)相结合。化学激活受体基因(chemokine - recepter gene) CCR 5 简单的缺失能导致抗 HIV 和 AIDs(艾滋病)。SNP 图谱的好处是覆盖了整个人类基因组,因此通过比较和核对患者 SNP 的图型和频率,研究者能鉴定出哪种 SNPs 是和哪种疾病相结合,对一些疑难病的解决将是更有效的。SNPs 将帮助人们确定许多遗传病的基础,从而为新的治疗方法提供靶标。这种独特的知识,将会改变医学的各个方面。此外,SNPs 还能解决一些学术理论问题,如我们共同的祖先以及世界上人群和文化的迁移。

4. 关键的特异 DNA 序列

所有真核生物染色体需要具备有 3 种类型的 DNA 特异的核苷酸序列,包括 DNA 复制起点(DNA replication origin)、着丝粒(centromere)、端粒(telomere)(详见染色体部分)。

7.2.1.2 DNA 的构象(conformation)

DNA 分子不仅一级结构具多样性,其二级结构和高级结构也不是千篇一律的。已经 X 射线衍射分析表明 DNA 的二级结构具有多态构象,此为二级结构的多态性(polymorphism),如 A - DNA、B - DNA、C - DNA、E - DNA、Z - DNA 等。其中 B - DNA 双螺旋二级结构较稳定,在活细胞中多以此构象存在。Watson 和 Crick(1953)提出的右手双螺旋 DNA 即为 B - DNA。在 DNA 构象中除 Z - DNA 为左手螺旋外,其余均为右手螺旋。在一定条件下 DNA 构象可发生改变,如 B - DNA 变构为 A - DNA、Z - DNA 等。在这几种构象的 DNA 结构特征中,大沟和小沟的特征对遗传信息的表达至关重要,因为它是调控蛋白识别遗传信息的位点。基因调控蛋白都是通过其分子的特定氨基酸侧链与沟中碱基对两

侧潜在的氢原子供体或受体形成氢键，识别 DNA 的遗传信息。在大沟和小沟中这些氢原子的供体和受体及其排列又不相同，大沟携带的遗传信息多于小沟的。同时沟的宽窄和深浅也直接影响碱基对的暴露程度，从而影响调控蛋白对 DNA 遗传信息的识别。如 B－DNA 大沟宽而略深，小沟窄而略浅；A－DNA（包括 DNA－RNA 杂交分子）的大沟极深、小沟宽而浅，其携带遗传信息的碱基对在小沟暴露的较多；而 Z－DNA 小沟窄而深、大沟消失，富含信息的碱基对在大沟的位置上暴露于螺旋的表面。可见调控蛋白对 Z－DNA 信息识别方式与对 B－DNA 的不同；对 A－DNA 的识别方式更不同于 B－DNA。沟的深浅主要决定于螺旋轴的位置，沟的宽窄主要决定于两个糖苷键（C－N 苷键）与碱基对的相对位置和糖苷键的顺反构象。

B－DNA 在一定的生理条件下可部分变构为 Z－DNA。B－DNA 构象活性最高，它变构为 A－DNA 后仍具活性，但是局部变构为 Z－DNA 后活性明显降低。在邻近调控系统中，与调控区相邻的转录区被 Z－DNA 抑制。当 Z－DNA 转构为 B－DNA 后转录又开始活化。在远距离调控系统（转录区在上千个碱基对之外），Z－DNA 通过改变负超螺旋水平决定聚合酶能否与模板链结合，来调节转录起始活性。Z－DNA 的形成对 DNA 超螺旋化有重要意义，只要有一小段 DNA 由 B－DNA 转构为 Z－DNA，DNA的超螺旋结构就可能发生很大变化，这种变化对基因表达调控是必需的。

7.2.2 染色质蛋白

7.2.2.1 组蛋白（histone）

组蛋白是真核生物染色质的主要结构蛋白，它在基因表达调控中也起重要作用。组蛋白是一类碱性蛋白，等电点一般在 pH 10.0 以上，这是由于它们含有较多的碱性氨基酸（如 Lys、Arg 等）所致。这类蛋白的相对分子质量一般为 10 000～20 000 多，具有很高的正电荷比例，可与带负电荷的 DNA 紧密结合。这种结合是非特异性的。用聚丙烯酰胺凝胶电泳可将组蛋白分为 H1、H2A、H2B、H3 和 H4 5 种组分（图 7－8）。这 5 种类型的组蛋白几乎存在于所有真核细胞。从功能上 5 种组蛋白可分为两组：①核小体组蛋白（nucleosomal histone），包括 H2A、H2B、H3 和 H4，它们有相互作用形成聚合体的趋势。通过 C 端的疏水氨基酸相互结合形成核小体的核心，N 端带正电荷的氨基酸位于核小体核心的外部以便与 DNA 分子结合，有助于 DNA 缠绕形成核小体，这也为基因的表达调控所必需。而且不同核心组蛋白的 N 端所起的作用不同。这四种组蛋白没有种属和组织的特异性，在进化上相当保守，特别是 H3、H4 是所有已知蛋白中最为保守的，H4 又更为保守，几乎每种真核生物细胞的都一样。如牛、猪、大鼠的 H4 氨基酸序列完全相同；牛和豌豆的 H4 组蛋白 102 个氨基酸残基中只有 2 个不同，而它们的进化分岐已有 3 亿年的历史。这种进化的保守性表明它们的功能几乎涉及它们所有的氨基酸，以致任何一个位置上的变化对细胞都将是有害的。如将一个在体外

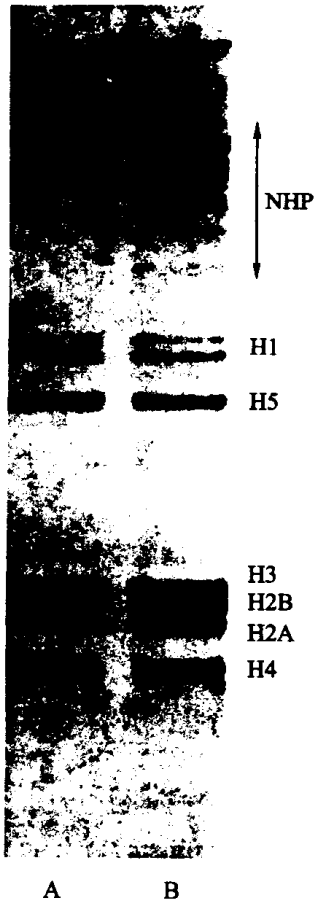


图 7－8 组蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳带型
A. 鸡红细胞染色质；B. 鸡红细胞核（自 E. M. Bradbury, 等）

突变的组蛋白基因引入酵母基因组取代正常的基因，结果许多突变是致死的，有的虽未致死，也引起基因表达的变化。②H1 组蛋白，分子较大(约含 220 个氨基酸)，其球形中心在进化上较保守，C 端和 N 端两个"臂"的氨基酸变化较大，因此 H1 组蛋白在进化上不像核小体组蛋白那么保守，有一定的种属和组织特异性。H1 组蛋白在构成核小体时起连接作用。在哺乳动物细胞已发现有 6 种 H1 组蛋白亚型。在鱼类、两栖类和鸟类成熟的红细胞中 H1 被 H5 取代。又有的生物如酵母无 H1，其染色质几乎均表现为活化状态。

7.2.2.2 非组蛋白(non-histone)

除了组蛋白外，所有与真核染色质结合的蛋白质统称为非组蛋白蛋白质(non - histone proteins, NHP)。非组蛋白也称为"酸性蛋白"(acidic protein)以区别于碱性的组蛋白。已经实验表明真核染色体骨架(chromosome scaffold)蛋白属于非组蛋白。如 SC1 和 SC2(scaffold 1 and 2)为两种高相对分子质量(分别为 1.7×10^5 和 1.35×10^5)的骨架蛋白。SC1 即为拓扑异构酶Ⅱ，已从 HeLa 细胞中期染色体提取、纯化制备出单克隆抗体，并定位于 HeLa 染色体长轴中心区，它与拓扑异构酶Ⅰ协同作用控制 DNA 拓扑结构。在间期核中的非组蛋白是指那些与染色质特异 DNA 序列相结合的蛋白质，称为序列特异性 DNA 结合蛋白(sequence - specific DNA - binding protein)。研究这一类蛋白的主要困难是分子小、拷贝数太少，难以分离鉴定。近年来根据非组蛋白特异 DNA 序列亲和的特点，应用 DNA 克隆技术制备一定长度的序列特异的 DNA 片段，经放射性标记获得一段有放射活性的特异 DNA 序列，将其与要检测的细胞核提取物混合进行凝胶电泳。通过凝胶延滞实验(gel retardation assay)可知，未结合蛋白质的 DNA 迁移最快，结合蛋白质的 DNA，有迁移延滞现象，结合蛋白分子越大的 DNA，其迁移延滞现象越明显；再经放射自显影，可见一系列 DNA 带谱，每条带代表不同的 DNA - 蛋白质复合物；然后再用细胞组分分离法将其进一步分开，在此实验基础上，应用特异 DNA 亲和层析(DNA affinity chromatography)或基因工程方法也能有效地分离鉴定这类 DNA 结合蛋白。

序列特异性 DNA 结合蛋白首先是在细菌和噬菌体中发现并被提纯鉴定。在真核细胞中至今已发现诸多的特异 DNA 序列结合蛋白。可将其分为不同的结合蛋白家族，分别以不同的模式与特异 DNA 序列结合。例如，α 螺旋 - 转角 - α 螺旋模式(helix - turn - helix motif)、锌指模式(zinc finger motif)、亮氨酸拉链模式(leucine zipper motif)、螺旋 - 环 - 螺旋模式(helix - loop - helix motif)(图 7 - 40)，它们都属于基因调节蛋白。还有一类高迁移率族(high mobility group, HMG)蛋白，也是结合蛋白，早已鉴定出有不同的 HMG(如 HMG1、HMG2、HMG14、HMG17)。但长期对其如何与 DNA 结合及其功能知之甚少，一般认为这类蛋白可能与超螺旋结构有关，现已知它是以另一种方式与特异 DNA 序列结合(见图 7 - 41)，具有弯曲 DNA 的作用，通过弯曲 DNA，促进与邻近位点相结合的其他转录因子的相互作用而激活转录。如一种称为 UBF 的 HMG 蛋白能激活 RNA 聚合酶Ⅰ对 rRNA 基因的转录，UBF 以二聚体形式结合 DNA，通过与 DNA 相互作用使 DNA 围绕蛋白质形成环化结构，一般是使这段 DNA 被分隔开的两个调控序列靠近，以与一个或多个转录因子结合激活转录(详见本章 7.6)。

这类非组蛋白最大的特性就是能识别特异的 DNA 序列，识别的信息来自 DNA 的核苷酸序列，识别的位点一般是在 DNA 双螺旋的大沟部分，识别和结合是通过氢键和离子键。这些结合蛋白所识别的特异 DNA 序列在进化上很保守，比如两种果蝇虽已在 6 千万年前

发生分岐，但它们 DNA 识别位点的序列却完全一致；另一特性是非组蛋白的多样性，它的种类很多，约可达百种，在不同组织细胞中其种类和数量常不相同。在每个真核细胞中约有 1 万个分子，约占细胞总蛋白的 1/5 万，但却有多方面重要功能。已有越来越多的实验表明，这一类 DNA 结合蛋白涉及 DNA 分子折叠、染色质包装、DNA 复制、转录、基因表达调控以及与 DNA 修复有关的酶和蛋白质。因此研究非组蛋白对深入揭示染色质包装、DNA 复制、转录、基因表达调控以及 DNA 修复等都有重要意义。

7.2.3 染色质结构的基本单位——核小体

染色质是 DNA 和蛋白质的复合物。但是，DNA 和蛋白质所形成的染色质是什么样的结构，多年来曾有不少假说，主要出于推测。直到 1974 年 Kornberg 等对染色质进行酶切和电镜观察，才发现了核小体(nucleosome)是染色质的基本结构单位。

在光镜下轻轻地将间期核弄破，在电镜下检查其内容物，大部分染色质呈直径约 30 nm 的纤维。如果处理这种染色质，使其部分伸展，于是在电镜下可见一系列的串珠样结构(图 7－9)。每个珠是一个核小体核心颗粒(nucleosome core particle)，其间串连的丝为 DNA 双螺旋。这种在核心颗粒之间的 DNA 称为连接 DNA(linker DNA)。串珠样的结构称为核小体链。

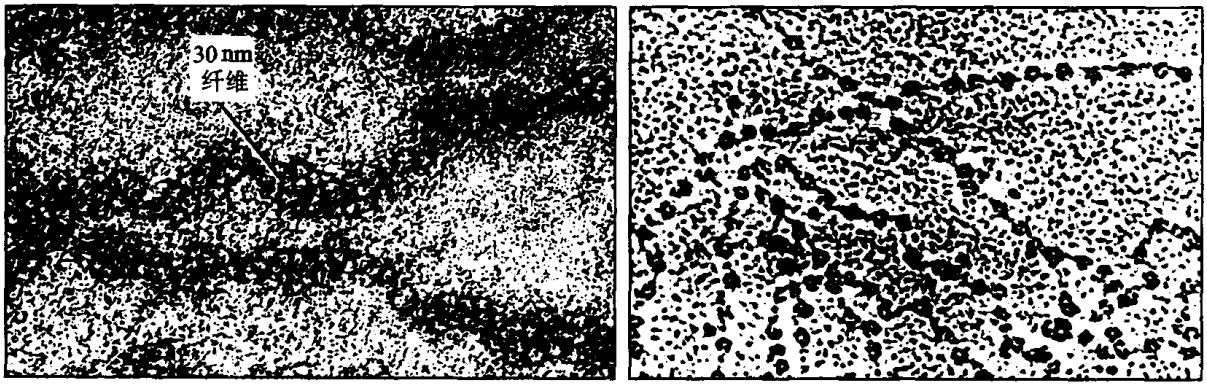


图 7－9 染色质纤维的电镜照片

A. 直接从间期核分离的染色质自然状态的结构，纤维直径约为 30 nm(引自 B. Hamkalo, 等)；B. 30 nm 的染色质纤维解聚后呈串珠样结构，核小体的核心颗粒直径约 10 nm，连接 DNA 直径约 2 nm(引自 O. L. Miller Jr)

用微球菌核酸酶(micrococcal nuclease)消化核小体链适当时间后，连接 DNA 被降解，获得了核小体的核心颗粒。一个核心颗粒是由 4 种组蛋白(H2A、H2B、H3 和 H4)，各两个分子形成的八聚体及其上缠绕的 146 bp(绕 1.75 圈)的 DNA 构成的(图 7－10)。这 4 种组蛋白也称为核心组蛋白(core histone)，其上缠绕的 DNA 称为核心 DNA(core DNA)。核小体是指核心颗粒加上邻接的连接 DNA，即每个核小体包括 4 种组蛋白的八聚体和约 200 bp 的 DNA (146 bp 的 DNA 缠绕组蛋白核心，平均约 50 bp 是核小体核心颗粒之间的连接 DNA)，围绕核心组蛋白约 2 圈。在 DNA 链进出核心颗粒处有一分子的组蛋白 H1 与 DNA 结合，锁住核小体的核心颗粒(图 7－11)，从而稳定了核小体的结构。也有人将核小体的概念公式化，写成：

$$\text{核小体} = \frac{\text{146 bp DNA} + 2(\text{H2A、H2B、H3、H4})}{\text{核心颗粒}} + \text{连接 DNA} + \text{H1}$$

实际连接 DNA 的长度变化很大，在不同的机体、不同的组织细胞核小体的连接 DNA 长度的变化范围在 0～80 bp 不等。

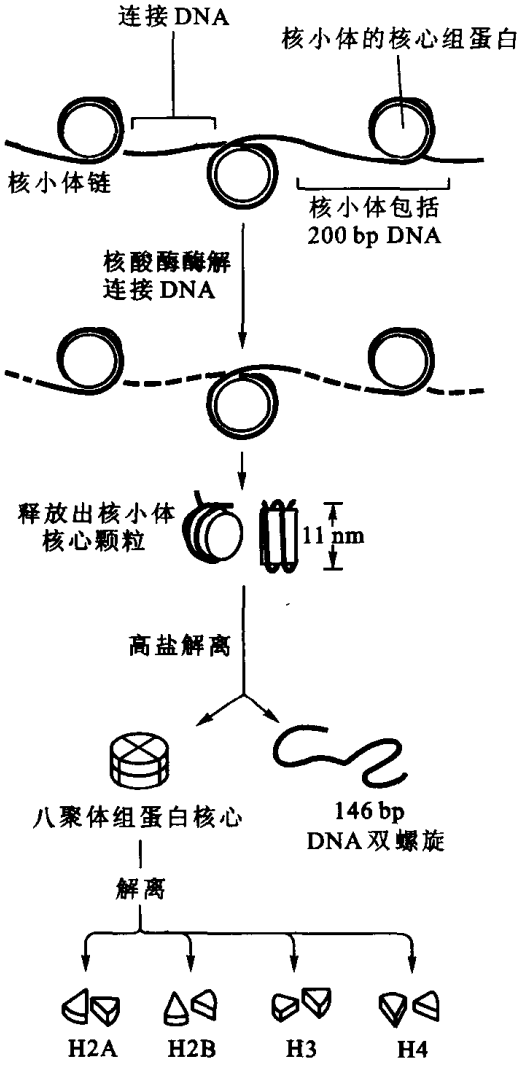


图 7－10 核小体的性质及结构成分示意图

如图所示，核小体链。用核酸酶（或微球菌核酸酶）酶解连接 DNA，从染色质中释放出核小体核心颗粒（核酸酶能降解暴露的 DNA，不能酶解缠绕在核小体核心颗粒上的 DNA），用高浓度盐液解离分离的核小体，成为其蛋白质核心和 DNA。八聚体组蛋白核心进一步解离成为 4 种组蛋白。DNA 的长度为 146 bp（反应早期可得到 166 bp 的 DNA 片段，但不稳定，进一步降解得到 146 bp 片段，较稳定，由于失去 H1 后，DNA 两端各有 10 bp 被降解所致）（引自 B. Alberts, 等）

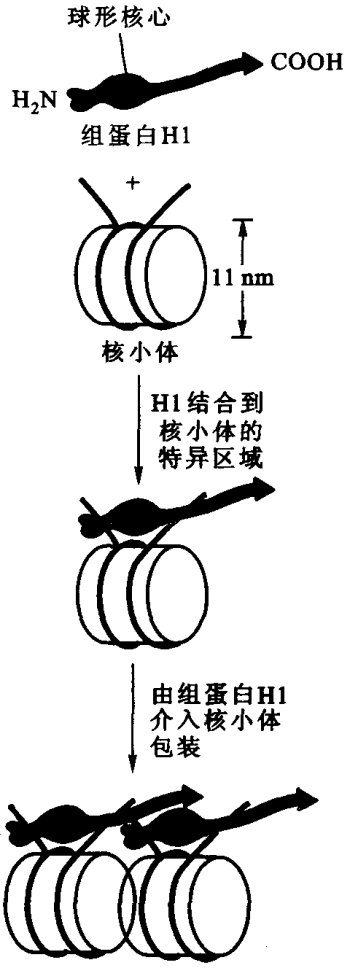
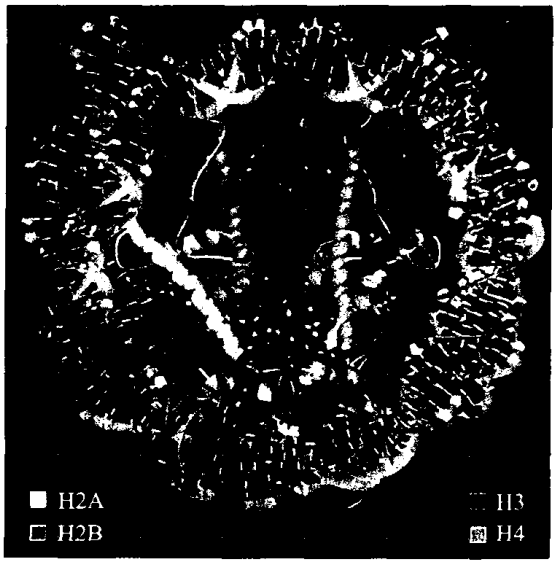


图 7－11 组蛋白 H1 在核小体上的位置及作用示意图

组蛋白 H1 球形的核心，结合到每个核小体靠近 DNA 螺旋进出组蛋白八聚体的位置，当 H1 存在于核小体上，DNA 166 bp 被保护免受微球菌核酸酶的消化。组蛋白 H1 对维持邻近核小体包装在一起有作用（引自 B. Alberts, 等）

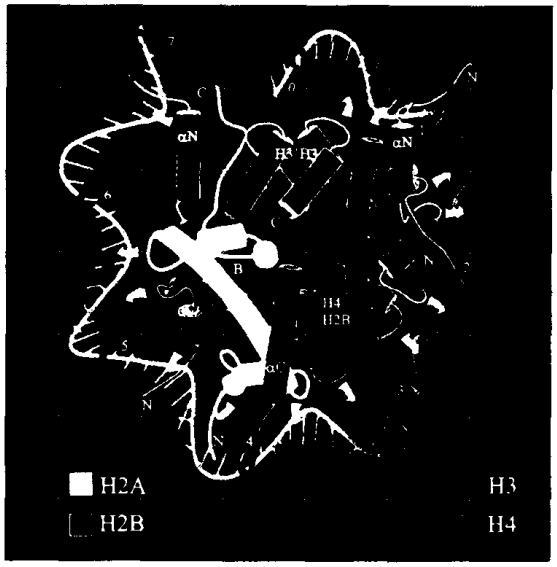
至于核小体核心颗粒是什么形状的？4 种组蛋白分子是如何结合成八聚体的？早期的

工作认为核小体是球形的，近些年经 X 射线衍射及中子散射等方法研究获得了核小体核心颗粒清晰的图像(图 7－12)。已证实核小体核心颗粒是圆盘形的，直径为 11 nm、高约 6 nm，具有二分对称性(dyad symmetry)。核心颗粒的 8 个组蛋白分子组成 4 个异二聚体：2 个 H2A－H2B 二聚体和 2 个 H3－H4 二聚体(图 7－12A、C)。2 个 H3－H4 二聚体在核心颗粒中心彼此结合形成四聚体，2 个 H2A－H2B 二聚体位于 H3－H4 四聚体的两侧。4 个异二聚体的每一个约结合 DNA 30 bp。通过离子键和氢键结合，它们接触的部位正是 DNA 双螺旋向内向组蛋白侧的小沟处，约 1 nm 间距(图 7－12C)。在这些接触点之间可见这 2 个分子是分开了一个相当的空间，这可能是为 DNA 转录因子和其他 DNA－结合蛋白提供了通路。



A

B



C

图 7－12　用 X 射线晶体衍射所显示的核小体三维结构

A. 通过 DNA 超螺旋中心轴所显示的核小体核心颗粒 8 个组蛋白分子的位置；B. 垂直于中心轴所见的核小体核心颗粒为明显的圆盘形；C. 简化的半个核小体核心颗粒的示意模型，示一圈 DNA 超螺旋(73 bp)和 4 种核心组蛋白分子，每种组蛋白可见有 3 个 α 螺旋(由柱形表示)和一个 N 端伸展的尾部，它通过 DNA 伸出核心颗粒，组蛋白分子和 DNA 之间的相互作用部位以白钩标示(引自 Karolin Luger 等，1997)

为什么 DNA 双螺旋能缠绕在核心组蛋白上？这是核小体在 DNA 上的定位问题。就现在所知，这不是由于组蛋白八聚体和特异 DNA 序列相互作用的结果，而是由于 DNA 双

螺旋本身具有的可弯曲性决定的。DNA 分子有一种结构特性，它具有形成环(loop)的倾向，在 DNA 双螺旋弯曲时，需要压缩螺旋的小沟，在小沟中富含 A－T 序列比富含 G－C 序列更易压缩。这样富含 A－T 的小沟最大限度地在 DNA 螺旋的内侧(图 7－12C)。对核小体定位的另一种重要影响是在 DNA 上存在有与 DNA 紧密结合的蛋白质，阻碍了核小体的形成。正因为如此，DNA 的一些区域缺乏核小体，有几百 bp 长。用痕量的 DNase Ⅰ处理，即可被消化，而连接 DNA 不被消化。因此称此无核小体的 DNA 区域为核酸酶超敏感位点(nuclease－hyper－sensitive site)，或称 DNase Ⅰ超敏感位点。这些位点常位于基因的调节区。已有实验证明超敏感位点是活性染色质的特点，是转录因子最可能结合的部位。

实验表明核小体的形成和在染色质的精确定位是真核基因表达所必需。总的有两方面的作用：①提供一个框架(scaffold)，使转录因子之间的传递更有效；②染色质结构的不均一性，即其某些区域不形成核小体，从而保证了转录因子易于接近染色质 DNA 模板。

7.2.4 核小体链如何形成 30 nm 染色质纤维

由 DNA 分子形成核小体链，这是 DNA 包装成染色质的一级结构(一般写为约 10 nm 直径，核小体核心颗粒直径为 11 nm)。但是，在生活的细胞内染色质很少呈伸展的串珠样结构，而是由核小体链包装成更紧密有序的高一级结构，形成 30 nm 的染色质纤维，已提出了许多模型来解释核小体链如何包装成 30 nm 纤维。其中螺线管模型(solenoid model)已为一般学者所认可。这一模型(图 7－13)认为组蛋白 H1 对核小体链包装成 30 nm 纤维起了重要作用。在组蛋白 H1 存在时，由核小体链螺旋盘绕，形成每圈 6 个核小体，外径 30 nm、内径 10 nm、螺距 11 nm 的螺线管。在体外如将 Mg^{2+} 加入有 H1 及 10 nm 纤维的样品中，则可形成 30 nm 纤维；如缺少 H1，虽加入 Mg^{2+} 也不能形成 30 nm 纤维。已证明在哺乳动物细胞组蛋白 H1 分子约有 6 个密切相关的亚型，负责将核小体聚在一起形成 30 nm 纤维，每个 H1 分子通过其球形蛋白结合到核小体的专一位点，其臂伸展接触到邻接核小体组蛋白核心的其他位点，这样核小体被拉在一起成为有序排列的直径为 30 nm 纤维(图 7－13)。实际由于连接 DNA 长度不同及偶有无核小体序列的存在，使 30 nm 纤维的直径不完全一致。螺线管(30 nm 纤维)是染色质包装的二级结构。

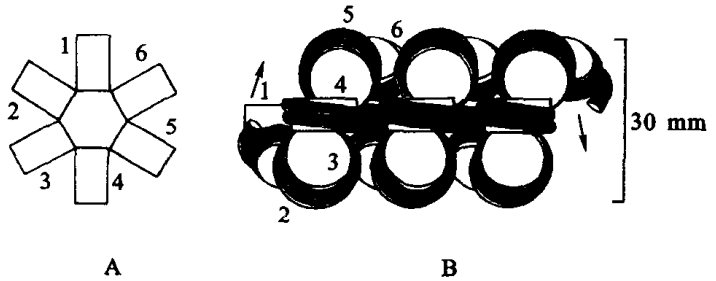


图 7－13 由核小体链包装成 30 nm 染色质纤维

A. 顶面观，6 个核小体呈辐射状排列；B. 侧面观，这种类型的包装每个核小体需要 1 个分子的组蛋白 H1(未表示出)，虽然 H1 连接核小体的位置已被确定，但 H1 分子在 30 nm 纤维中的位置尚不完全清楚。有谓 H1 位于中空螺线管内部(引自 B. Alberts, 等)

间期核的染色质，每条染色体的染色质不是呈相同的包装状态，有些区域比其他的变得更伸展。一般染色质转录 RNA 的区域更伸展松散，成约 10 nm 纤维；转录停止的区域包装较紧密成 30 nm 纤维。这样，间期核染色质的形态因不同细胞类型而异，主要根据基因是否处于表达状态。处于表达状态的活性染色质(active chromatin)和不表达的非活性染色质(inactive chromatin)在生化上是有区别的。比如：①组蛋白 H1 至少不是紧密地结合到活性

染色质;②4 种组蛋白虽以正常的量存在于活性染色质,但与非活性染色质相比,它们是高度乙酰化的,有人认为组蛋白 N 端半胱氨酸残基乙酰化是染色质具有转录活性的标志;③与非活性染色质比较,活性染色质中组蛋白 H2B 是不大被磷酸化的;④活性染色质在许多物种(包括人和果蝇)的组蛋白 H2A 较少有变异的形式;⑤在活性染色质中的核小体选择性地结合 HMG14 和 HMG17,它们仅存在于活性染色质中,在全部染色质中大体上每 10 个核小体结合到 1 个。它们的氨基酸序列在进化上是高度保守的,这意味着它们有重要功能(见前面非组蛋白部分)。以上这些变化,可能在展开具活性基因的染色质方面有重要作用,尚待直接的实验证明。此外,根据染色质的形态结构和功能的不同,可将染色质分为常染色质和异染色质两种类型。

7.2.5 常染色质和异染色质

在 20 世纪 30 年代,用光镜研究高等真核细胞间期核染色质具有两种类型:用碱性染料染色,将着色深的、高度凝集的染色质称为异染色质(heterochromatin),其余所有着色浅的、不太凝集的染色质称为常染色质(euchromatin)。随着研究的不断深入,对它们本质的差异,有了以下的认识。

1. 常染色质,在间期核中染色质纤维处于松散伸展状态呈 30 nm 纤维,也有 10 nm 纤维。构成常染色质的 DNA 序列主要为单一序列和一些重复序列,其碱基组成富含 G - C。结构基因及绝大多数基因位于常染色质上,遗传活性大。常染色质一般 DNA 复制较早,多在细胞周期 S 期的早期。在中期染色体上定位于 R 带的深染带及 G 带的浅染带。常染色质至少有两种形态:约为基因组的 10% 为活性染色质,其余为无活性的常染色质。

2. 异染色质,在间期核中染色质纤维处于螺旋化凝集状态。异染色质又分为结构异染色质(constitutive heterochromatin,或称组成型异染色质)和兼性异染色质(facultative heterochromatin)。结构异染色质主要由相对简单、高度重复的 DNA 序列构成,富含 A - T,具有明显的遗传惰性,转录上无活性,但有特殊的功能。在细胞周期中除复制期以外均处于高度凝集状态,DNA 的复制较晚,主要在 S 期的晚期。在间期核中结构异染色质常聚集形成染色中心(chromocenter)。在中期染色体上定位于着丝粒区、端粒、次缢痕以及染色体臂的某些区段,具有保护着丝粒、控制同源染色体配对以及调节作用等。

兼性异染色质是指某些细胞类型或者在细胞的一定发育阶段,原来的常染色质凝集失去其基因转录活性,变为异染色质。兼性异染色质不是由简单的重复 DNA 序列构成的。在不同的细胞类型兼性异染色质的量不同。一般胚胎细胞含量很少,在高度特化的细胞含量较多。这可说明,随着细胞分化,较多的基因逐次以染色质凝集状态而关闭,由于染色质紧密包装、凝集,致使基因活化蛋白不能接近它,而丧失基因活性。例如,雌性哺乳动物体细胞核内有两条 X 染色体,在发育早期,其中一条 X 染色体随机发生异染色质化,失去活性。在上皮细胞核中,此失活的 X 染色体称为性染色质或称巴氏小体(Barr body),紧靠核膜;在中性粒细胞核中,此异染色质化的 X 染色体呈一种鼓槌状。当卵母细胞进行减数分裂时,异染色质化的 X 染色体又回复为常染色质状态。可用异染色质化的 X 染色体进行性别鉴定,如检查羊水中的胚胎细胞可预测胎儿的性别;也可用于检查不正常的性染色体,比如有的女性具有 XXX 性染色体,男性具 XXY 性染色体等。

7.3 染 色 体

7.3.1 染色体结构模型

在细胞间期核内存在 30 nm 染色质纤维，这已为一般学者的共识。但是在细胞有丝分裂期，由 30 nm 纤维如何包装形成染色体，这是染色体的高级结构问题，近 30 多年来学者们曾提出了不少模型。其中较重要的有多级螺旋模型与骨架和辐射环模型。

7.3.1.1 多级螺旋模型(multiple coiling model)

A. L. Bak 等(1977)在光镜和电镜下研究人胎儿成纤维细胞的染色体，分离出直径 400 nm 的 11～60 μm 长的染色质纤维，称其为单位纤维(unit fiber)。在电镜下观察其横切面，表明它是由直径为 25～30 nm 的螺线管染色质纤维螺旋形成的圆筒结构。他称其为超螺线管(super－solenoid)，这是染色质包装的三级结构。由超螺线管再螺旋形成染色单体，是为染色质包装的四级结构，也称为染色体的四级结构模型。总的由 DNA 到形成染色体经过 4 级包装，其 DNA 的压缩比为：

DNA —压缩 7 倍→ 核小体 —压缩 6 倍→ 螺线管 —压缩 40 倍→ 超螺线管 —压缩 5 倍→ 染色单体

(200 bp 长约 70 nm)　(直径约 10 nm)　(每圈 6 个核小体，直径 30 nm，螺距 11 nm)　(直径 400 nm 长 11～60 μm)　(长 2～10 μm)

即由一个 DNA 分子长链包装成染色体共压缩了 8 000～10 000 倍。

7.3.1.2 骨架和辐射环模型(scaffolding model & radial loop model)

J. R. Paulson 和 U. K. Laemmli(1977)用硫酸葡聚糖(dextran sulfate)加肝素或用 2 mol/L NaCl 处理 HeLa 细胞中期染色体，去除组蛋白和一部分非组蛋白后，在电镜下观察，看到具有中期染色体形态特征、由非组蛋白构成的染色体骨架(scaffold)结构，从骨架周围伸出无数的 DNA 环组成的晕圈(图 7－14)。每个 DNA 环的基部锚定在骨架上。大多数 DNA 环至少有 10～30 μm 长(30～90 kb)。认为骨架组织 DNA 成为 DNA 环，维持染色体的形状。这个模型首次提出骨架在染色体中的分布和作用。在此基础上，M. P. F. Marsden 和 Laemmli(1979)又以 HeLa 细胞中期染色体为材料，通过二价阳离子的螯合作用，使染色体膨胀，作染色体切片，在电镜下观察，在染色单体横切面的中央，有一电子致密区(中央轴区)直径 20～30 nm 染色质纤维折叠成环，其基部固着于中央致密的非组蛋白骨架上，环围绕染色单体的骨架，向周围辐射伸展(环长约 0.6 μm)。进一步处理 20～30 nm 纤维，松散成约 10 nm 纤维，形成 3～4 μm 长的辐射环，从染色单体的中央向周围伸出(图 7－15)。他们认为 20～30 nm 染色质纤维首先折叠形成很多环，然后进一步缠绕环的基部靠近、集中固着在染色单体中央区域的骨架上，形成染色体。

上述两个染色体结构模型，其中螺旋结构和辐射环结构是染色体的基本结构。这两种结构分别或共同存在于许多真核生物的染色体中，因此重点学习这两个结构模型对进一步了解或探索染色体的超微结构有意义。

在多级螺旋模型中从 30 nm 纤维到形成染色体之间的纤维称为中间等级纤维。已经实验表明，有一些动物和植物染色体的结构，虽也属多级螺旋，但其中间等级纤维不同，各级

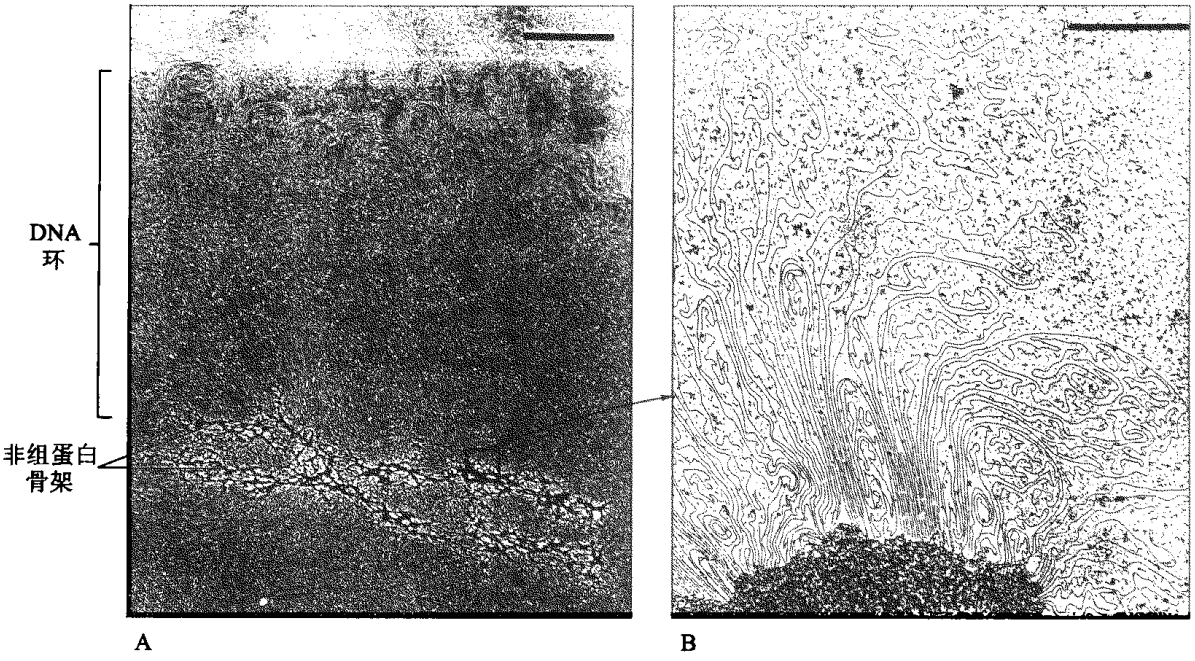


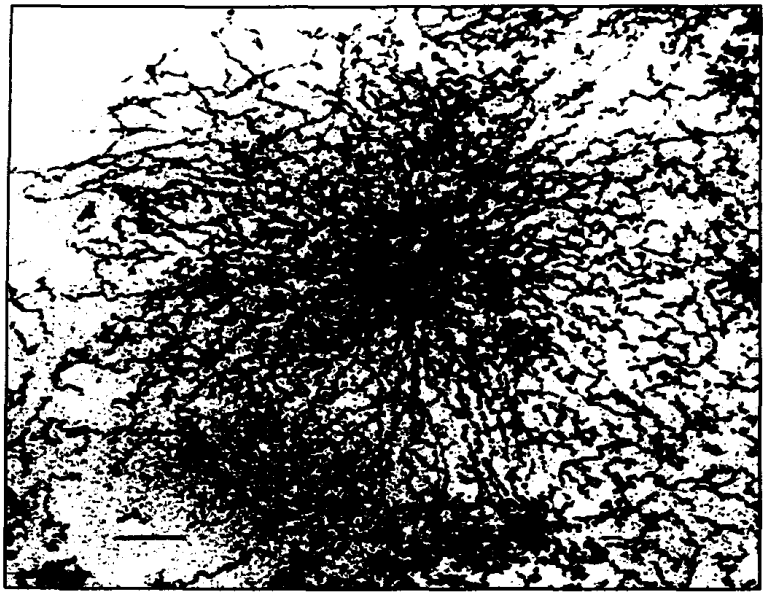
图 7－14　HeLa 细胞的去组蛋白中期染色体电镜照片

示染色体骨架及 DNA 环(用硫酸葡聚糖和肝素处理去组蛋白)A. 去组蛋白骨架仍保持中期染色体的形状,看来骨架是由致密的纤维网构成,其周围围绕大量 DNA 环(×50 000);B. 更高倍放大示 DNA 成环附着于骨架,注意 DNA 环的两端是从骨架上邻近的两点辐射出去(×150 000)(标尺=2 μm)(自 J. R. Paulson, U. K. Laemmli)

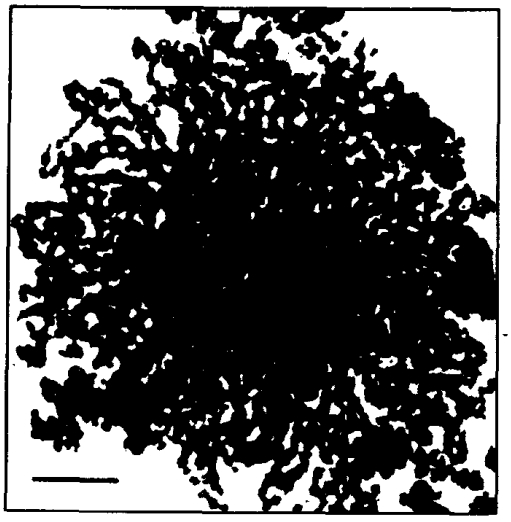
纤维直径大小也不一样,而且不全是简单的逐级螺旋,也有较复杂的螺旋结构。如牛肾染色体的结构(图 7－16)。

现在的问题是,Bak 等和 Laemmli 等所提的染色体结构模型,同是以人染色体为材料,为什么会得出两种迥然不同的结构模型(实际已报导的有 4 种结构模型,都是以人染色体为材料)? 这说明染色体结构的复杂性,也不能不说明染色体结构的显示与技术方法有关。对染色体结构的研究有一定难度,染色质纤维纤细且包装紧密,光镜的分辨率一般达不到观察 10 nm、30 nm 的水平;超薄切片透射电镜分辨率虽高,但不易观察染色质纤维包装的立体结构;扫描电镜虽能看到染色质纤维和染色体的立体结构,但制备样品时由于染色质对环境离子浓度变化及化学药物作用较敏感,易使染色质纤维融合、变形,失去其自然状态。因此作者采用扫描电镜、透射电镜、电镜细胞化学及细胞融合早熟凝集染色体(PCC)电镜技术,以及分离染色体骨架的 RNase－胶体金电镜定位等多种技术结合,对 20 余种动物(包括人)染色体的超微结构进行了研究。结果表明,不同种类动物间染色体的超微结构存在多样性,表现在染色体表面结构、染色质纤维的包装以及染色体骨架和轴等 3 个方面(图 7－17、7－16A)。

在人和不同种类动物间染色体超微结构具有明显差异。比如人的染色体,从实验中观察到既有辐射环,也有由辐射环形成的螺旋。由约 30 nm 染色质纤维形成辐射环,环的基部锚定在染色体骨架上。这与 Laemmli 等的辐射环模型是一致的,所不同的是相邻的辐射环较有规律地整齐地聚集、螺旋形成辐射环束。辐射环束的直径在不同期的染色体不完全一致。这些辐射环束附于染色体本体上,因此在染色体表面具有看来较为复杂的由辐射环



A



B

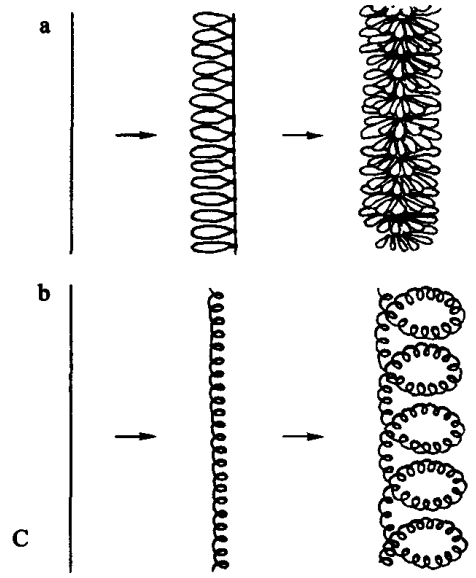


图 7－15 HeLa 细胞的中期染色体横切面电镜照片及辐射环模型图

A. 在固定包埋前用 EDTA 膨胀的染色体示 10 nm 染色质纤维呈辐射排列；B. 固定在含有 1.0 mmol/L $MgCl_2$ 的缓冲液中示 20～30 nm 染色质纤维从致密的中心呈辐射环辐射出去(标尺＝0.2 μm)；C. 辐射环模型(图 a)与螺旋模型(图 b)比较，如图所示辐射环模型其基本纤维(30 nm 纤维)首先形成许多环，然后缠绕起来，环的基部紧靠在一起成为染色单体的中心区(自 M. P. F. Marsden, U. K. Laemmli)

的染色质纤维螺旋形成的突起(图 7－17A)。

多年来一些学者一直探索想得到一种能代表所有真核生物染色体的统一结构模型，但是人染色体的结构模型看来难以代表全部真核生物染色体的结构。染色体的超微结构具有多样性，染色体的结构模型也具有多样性。

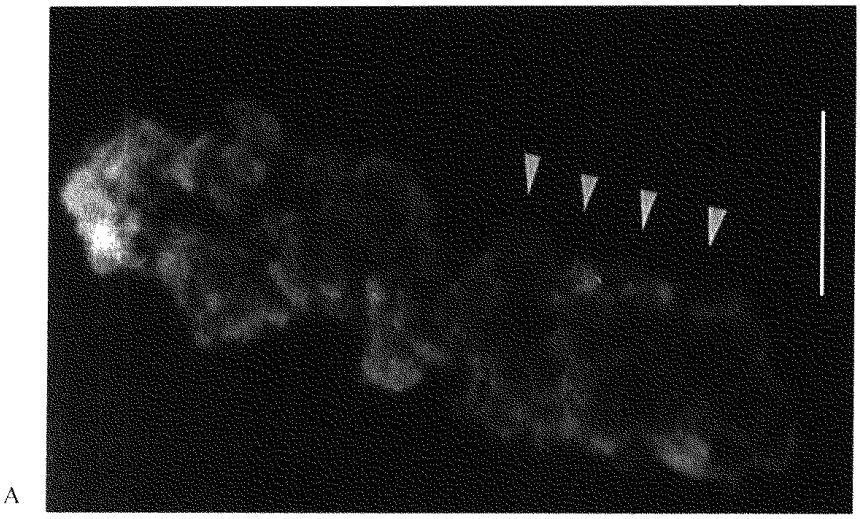
7.3.2 染色体的数目、形态和类型

在不同物种的细胞内都有一定数目、一定形态类型的染色体。可以说染色体的数目、形

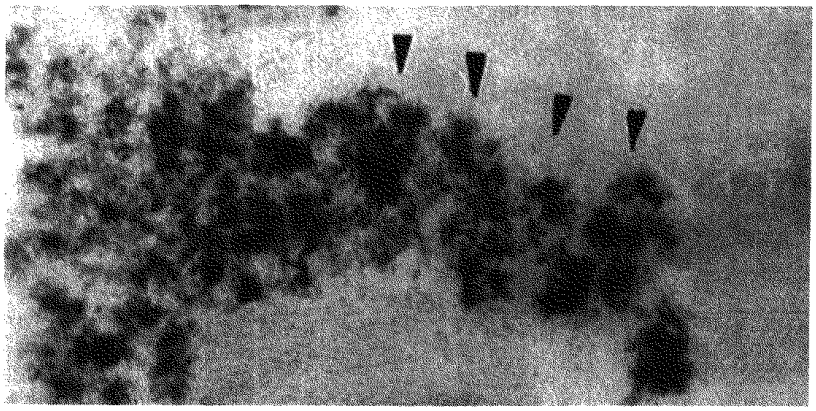
态及类型在每一物种的细胞内是相对恒定的。这对维持种的稳定有重要意义。

7.3.2.1　染色体的数目和倍性

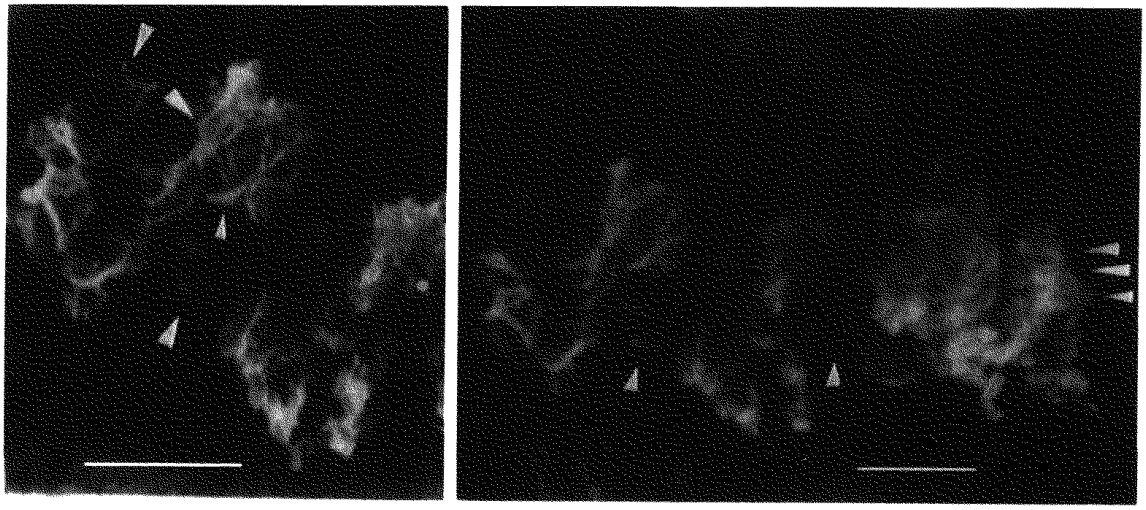
在性细胞内有一套形态大小各不相同的染色体，是为一个染色体组，称为单倍体(haploid)，以 n 表示。在体细胞内染色体常成对出现。每对染色体(称为同源染色体 homologous chromosome)，一条来自父方，一条来自母方，是为二倍体(diploid)以 $2n$ 表示。有些物种细胞内的染色体成倍增加，成为 $4n$、$6n$、$8n$ 等。有 $3n$ 或 $3n$ 以上者称为多倍体(polyploid)；这种状态称为多倍性(polyploidy)。同一个动物体内也有不同染色体倍数的细



A



B



C

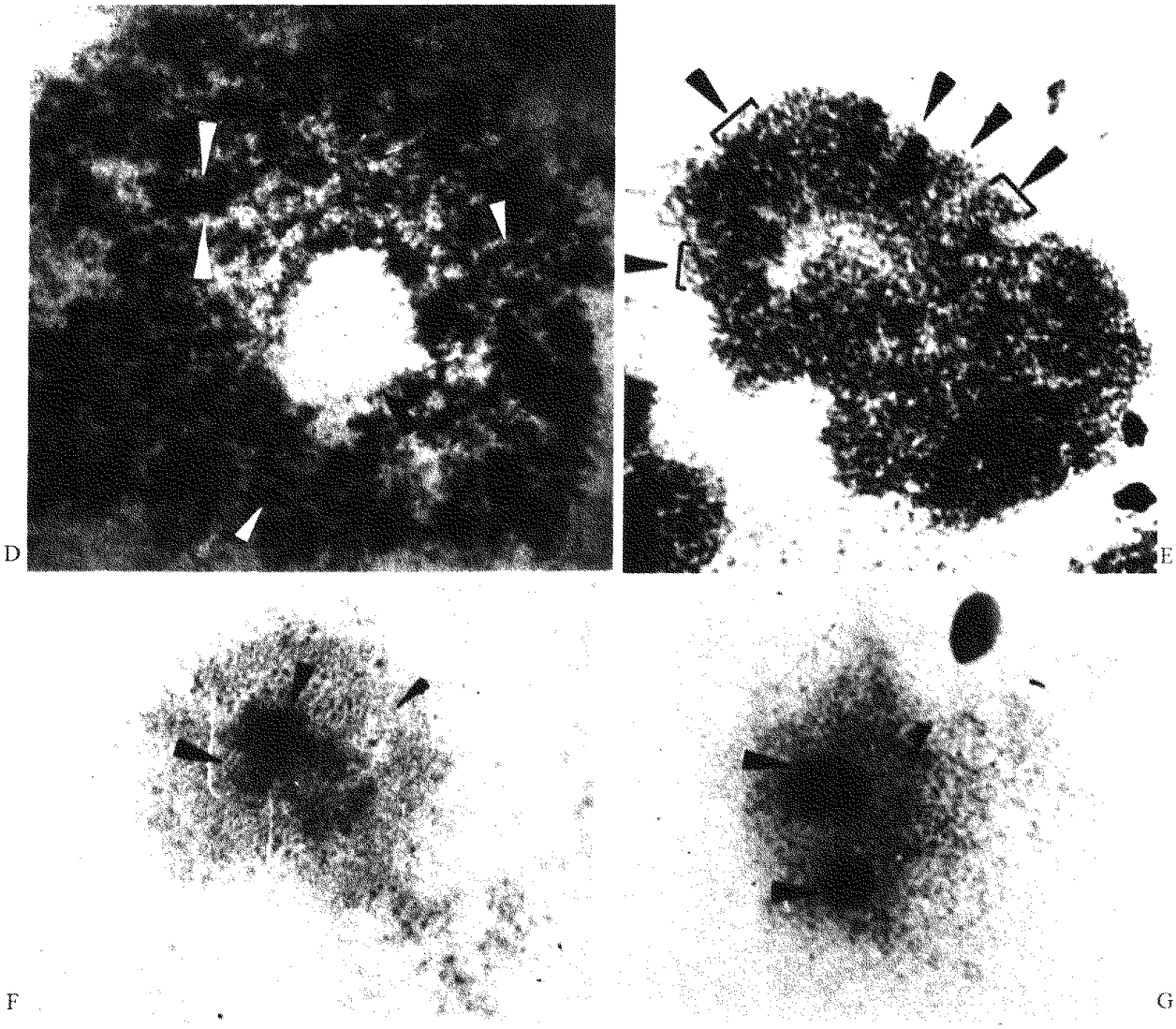


图 7－16 用多种技术方法显示的牛肾(BK)培养细胞染色体电镜照片

A. 扫描电镜照片用表面舒展技术及临界点干燥法制备样品，可见染色体表面有由 300～400 nm 染色质粗纤维形成的螺旋结构；B. 染色体纵切面透射电镜照片示染色体螺旋结构(×35 000)；C. BK 细胞早熟凝集染色体(PCC)电镜照片，由 CHO 有丝分裂中期细胞与 BK 的间期细胞融合，导致 BK 间期细胞发生早熟染色体凝集，它能反映染色质包装的正常状态，图为 DNA 已复制的晚 S－PCC 片段，C. 右图可见染色质纤维包装呈明显的几个大螺旋，箭头示大螺旋间的纤维连续，螺旋化程度由一端向另一端逐步加强。在结构紧密的一端，可见约 100 nm 纤维双股向紧缠方向缠绕形成 300～400 nm 纤维(标尺 1 μm)，在较松散的一端进一步放大(C. 左图)可见最细的约 30 nm 纤维双股并行或交叉形成约 100 nm 纤维(小箭头)，并可见双股约 100 nm 纤维(即 4 股～30 nm 纤维，大箭头)在端部回折(上箭头)。(在间期核电镜照片可见～30 nm 纤维是由双股 10 nm 纤维螺旋而成，未显示)；D. 分离的中期染色体按 Laemmli 等方法处理，使染色体膨胀，横切，透射电镜照片，可见染色体中央是“空心”的低电子密度区，在染色质区可见 30 nm、80－110 nm 染色质纤维(×60 000)；E. 原位中期染色体横切照片，其中一条染色单体可见“空心”的低电子密度区，周围染色质区是由染色质纤维(双股 100 nm 纤维)螺旋盘绕成 300～400 nm 纤维构成(×50 000)；F、G. 原位中期染色体横切、细胞化学电镜照片，经 Bernhard 方法处理可见在染色单体中央“空心”内充满了深染的骨架物质——RNP(大箭头)，且与染色质区的 RNP 相连续(小箭头)，后者分布在染色质纤维间。综上可见 BK 染色体是多级双股螺旋结构，其染色质纤维的包装：10 nm→～30 nm→80～110 nm→300～400 nm→染色单体(自刘凌云，等)

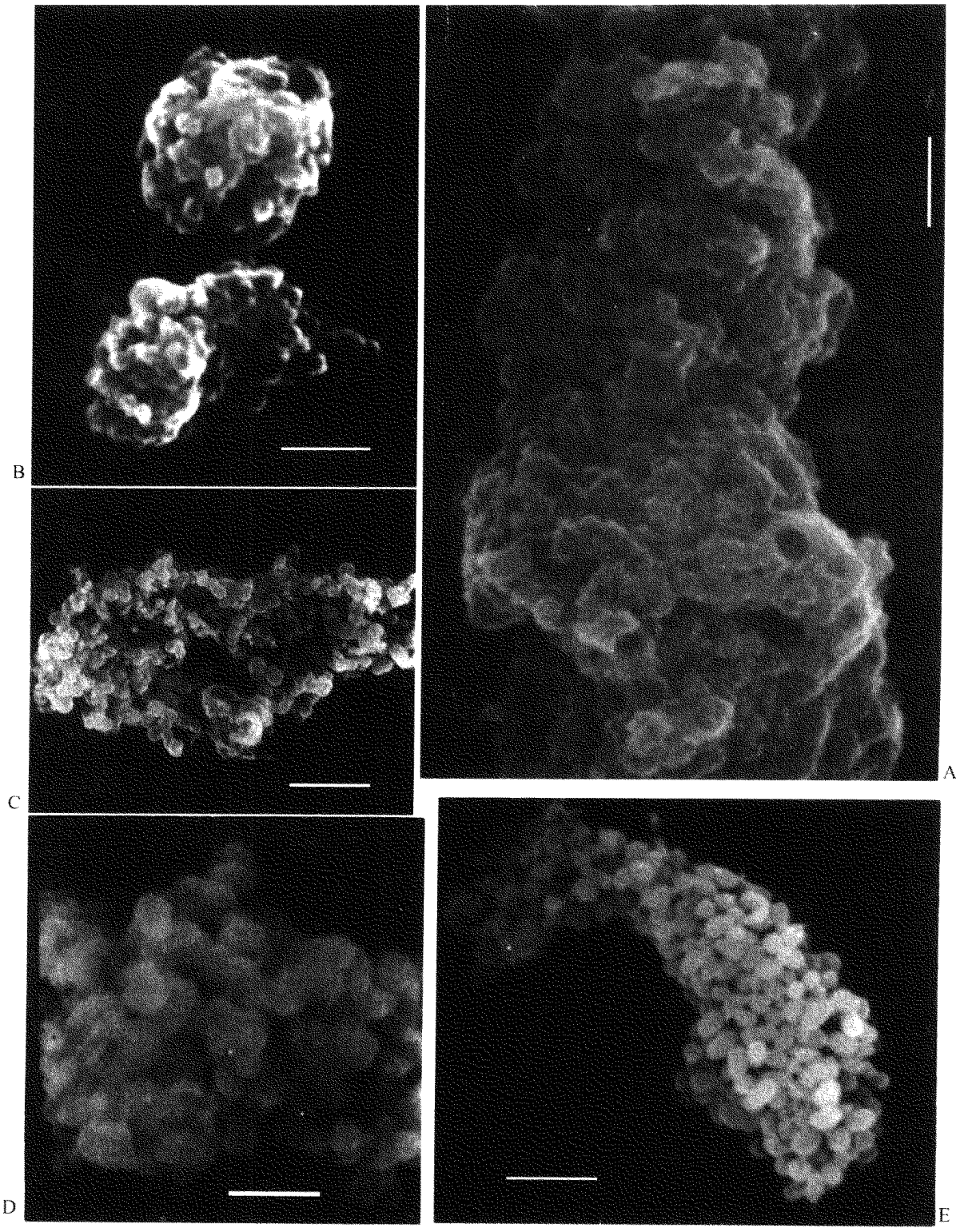


图 7－17　人(HeLa)及几种动物细胞中期染色体扫描电镜照片

用表面舒展技术及临界点干燥法制备样品。在样品制备过程尽量减少化学药品对染色体的作用，减少繁复的实验步骤，使染色质纤维能保持较自然状态。A. HeLa 细胞染色体(×11 000，标尺 1 μm)；B. 猪肾(IB－RS2)细胞染色体(×8 000，标尺 2 μm)；C. 无蹼壁虎(*Gekko swinhonics*)骨髓细胞染色体(×10 000，标尺 2 μm)；D. 中华大蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans*)骨髓细胞染色体(×8 000，标尺 2 μm)；E. 牛蛙(*Rana catesbeiana*)骨髓细胞染色体(×8 000，标尺 2 μm)。染色体表面结构的不同主要由染色质纤维包装不同所致。染色体骨架物质——RNP 的分布与染色体轴的形态也与染色质纤维包装有关，限于篇幅未显示染色质纤维的包装、染色体骨架和轴的多样性(自刘凌云，等)

胞，如成年大鼠肝细胞中常有 $3n$、$4n$、$6n$ 等多倍体细胞。肿瘤细胞中一般染色体数目不等，多高于 $2n$，成非整倍性。在植物界同源多倍体如 $3n$、$4n$ 较为习见，其特点是植株、果实形态增大、代谢活性加强，因此人们常以人工方法诱导多倍体。如异源 8 倍体小黑麦新物种已用于生产，还有 3 倍体无籽西瓜等。在人类全身 3 倍性是致死的，极为罕见，存活者仅为 2 倍体和 3 倍体的嵌合体。这些个体都是智力低下、并指、半侧肥大或萎缩等发育异常。但 3 倍性在流产胎儿中十分常见，成为流产的原因之一。全身 4 倍性更为罕见，但 4 倍体和其他高倍体细胞在一些组织和培养细胞中并不罕见。

染色体的数目不是绝对不变的。即使在正常的生理条件下也会有变化。比如有人检查 70 例正常人染色体，结果表明具正常数(46 条)的占 92.4%，多于或少于正常数的占 6.8%；有些动物如鱼类体细胞的染色体正常数的比例比人的还少。计数染色体时一般取其众数为正常染色体数。

7.3.2.2 染色体的形态结构和类型

细胞由间期进入分裂期时，间期核内约 30 nm 的染色质纤维包装形成染色体，在中期时包装得较为紧密，染色体的轮廓形态清楚，便于观察研究。

每条中期染色体是由两条染色单体(chromatid)组成的，也称为姊妹染色单体(sister chromatid)。两条染色单体仅在着丝粒(centromere)处连接；同时着丝粒又将染色单体分为两臂：短臂(p)和长臂(q)。根据着丝粒在染色体上的位置，可将染色体分为 4 种类型：中着丝粒染色体(metacentric chromosome, m)，两臂长度相等或大致相等；亚中着丝粒染色体(submetacentric chromosome, sm)两臂长度不等，相差较 m 的多；亚端着丝粒染色体(subtelocentric chromosome, st)，两臂长度相差很大，短臂很短；端着丝粒染色体(telocentric chromosome, t)，着丝粒位于染色体的端部(图 7－18、表 7－1)。

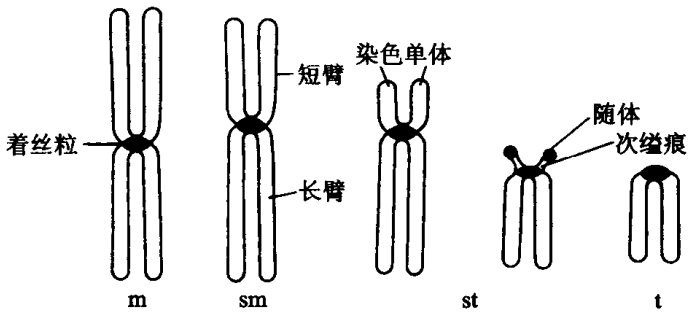


图 7－18 染色体各类型示意图
m：中着丝粒染色体；sm：亚中着丝粒染色体；st：亚端着丝粒染色体；t：端着丝粒染色体

着丝粒在染色体上的位置是由臂比(arm ratio)或着丝粒指数(centromere index)确定的，由此进行染色体的分类确定染色体的类型(表 7－1)。

表 7－1 根据染色体臂比或着丝粒指数确定着丝粒位置及染色体类型

着丝粒位置	臂 比①	着丝粒指数②	染色体名称
中部	1.0～1.7	50.0～37.5	m
亚中	1.7～3.0	37.5～25.0	sm
亚端	3.0～7.0	25.0～12.5	st
端部	7.0～∞	12.5～0.0	t

①臂比：每条染色体的长臂长度除以短臂长度即

$$臂比 = 长臂长度/短臂长度$$

②着丝粒指数：每条染色体短臂长度乘以 100 除以该条染色体全长

$$着丝粒指数 = \frac{短臂长度}{染色体全长} \times 100$$

1. 着丝粒：位于染色体臂的缢缩处或染色体端部，该缢缩处称为初缢痕或主缢痕(primary constriction)，在着丝粒的两侧各有一由蛋白质构成的 3 层的盘状或球状结构，称为动粒(kinetochore，也称为着丝动粒)，它与纺锤丝相连，与染色体移动有关，在分裂后期时，使两染色单体分开移向两极。着丝粒与动粒的结构和功能是密不可分的。因此有学者将其称为着丝粒－动粒复合物。可将其分为 3 个结构域：动粒结构域(kinetochore domain)、中央结构域(central domain)和配对结构域(pairing domain)(图 7－19)。动粒结构域位于着丝粒表面，具 3 层结构及其外的纤维冠(fibrous corona)。中央结构域包括着丝粒的大部分区域，是着丝粒区的主体，由富含高度重复序列的 DNA 构成，在人类基因组为由高度重复的 α 卫星 DNA 组成。在中央结构域内侧，是前期、中期染色体的两条染色单体在着丝粒处相互连接的区域，是为配对结构域，已发现有两类蛋白：内着丝粒蛋白(inner centromere protein，INCENP)和染色单体连接蛋白(chromatid linking protein，CLIP)，沿着配对结构域的表面分布，这些蛋白对染色单体的分离起作用。

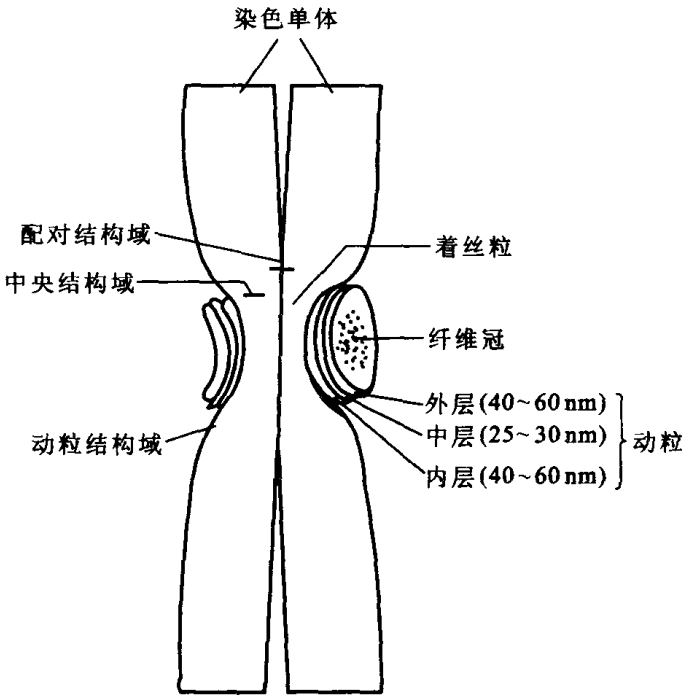


图 7－19 着丝粒－动粒复合物的结构域示意图

在着丝粒蛋白中目前研究较为深入的是 CENP－B，它位于着丝粒的中央结构域，且特异性地和 α 卫星 DNA 相结合，其结合必须有“CENP－B box”参与，“CENP－B box”是一个长度为 17 bp 的 DNA 序列：5′CTTCGTTGGAAACGGGA 3′。CENP－B 是由单一拷贝基因编码的 2.9 mRNA 的产物，是一种 DNA 结合蛋白，其上有 DNA 结合位点，对其氨基酸序列已有较详细的分析。由于 CENP－B 所在部位和其特异结合，推测它与染色体着丝粒的结构和动粒的结构形成有关。此外还发现有 CENP－A、CENP－C、CENP－D 及 CENP－E 等着丝粒蛋白，其结构与功能均有待进一步研究。

2. 次缢痕(secondary constriction)和核仁组织区(nucleolar organizing region，NOR)：在染色体上除了初缢痕外，还有缢缩的部位，是为次缢痕。它在染色体上的位置和大小是染色体特有的形态特征，可作为鉴别染色体的标志。每种生物染色体组中至少有一条或一对染色体上有次缢痕。有的次缢痕是核仁组织区所在部位(不是所有的次缢痕都是 NOR)。该

处有 rRNA 基因能合成 18S 及 28S rRNA(5S rRNA 是由 NOR 之外合成后进入 NOR 的)。因此 NOR 与核仁形成有关。

3. 随体(satellite):是染色体末端部分的球形或圆柱形的染色体节段,常通过次缢痕与染色体主体部相连。具有随体的染色体称为 sat－染色体。

4. 端粒(telomere):位于每条染色体的端部,为染色体端部的异染色质结构,主要功能是维持染色体稳定,防止末端粘连和重组,并能锚定染色体于细胞核内,辅助线性 DNA 复制等。已知真核细胞在有丝分裂过程中存在末端复制问题(end－replicating problem),即由于染色体末端 DNA 后随链的合成,致使子代 DNA 末端比母代 DNA 缺少数十个碱基,并形成 3′端突出结构,染色体末端结构很保守,主要由 3′突出序列、端粒重复序列和端粒结合序列(telomere associated sequence, TAS)组成(图 7－20A)。端粒重复序列富含 GT,常为 6～8

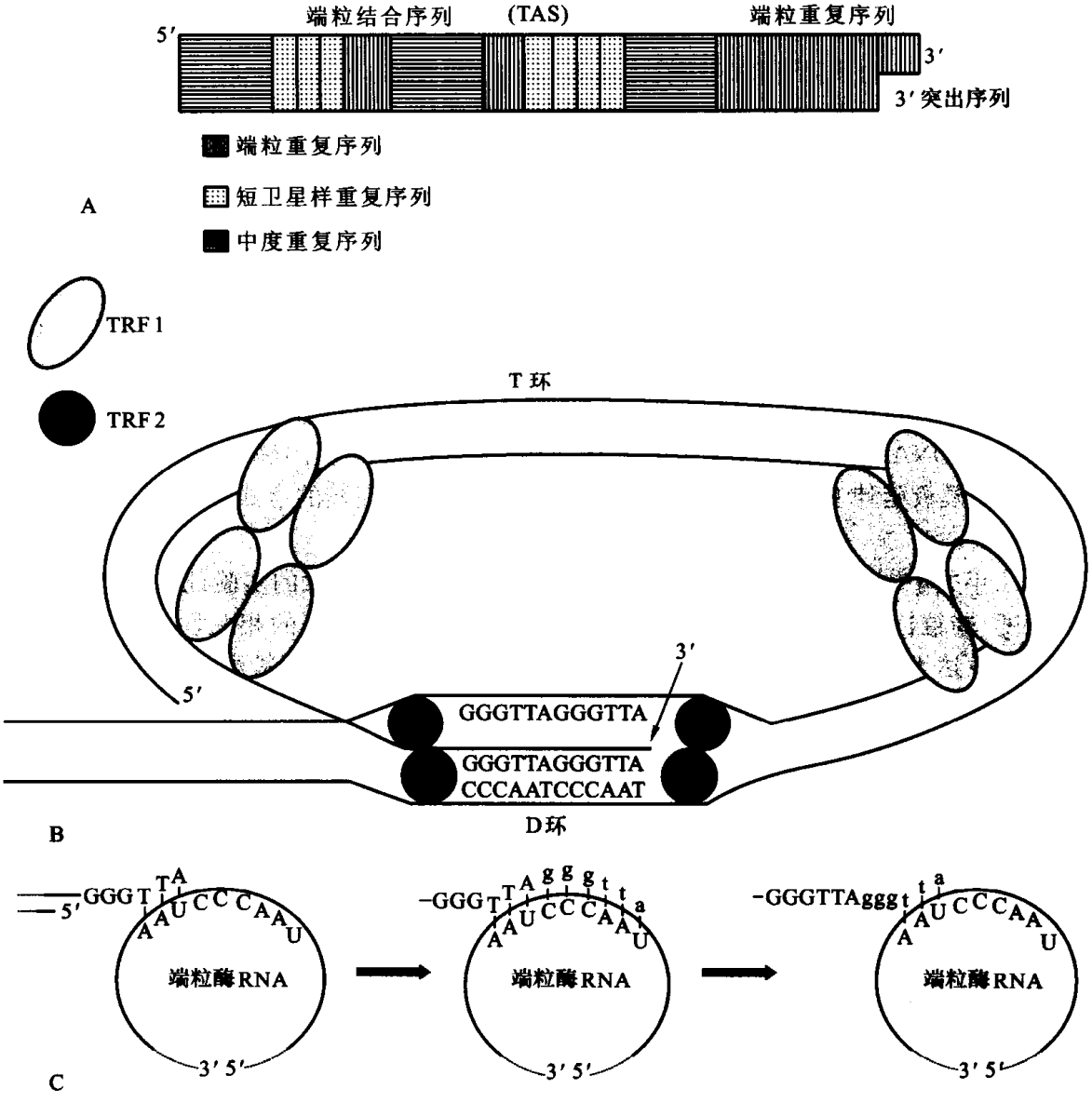


图 7－20 染色体末端结构及端粒酶维持端粒序列长度示意图

A. 染色体末端 DNA 序列; B. 染色体末端 DNA 环状结构; C. 端粒酶维持染色体端粒序列的机制,大写碱基示原有的端粒序列,小写碱基示新合成的端粒序列(A 和 C 仿 C. Cerni, 2000; B 仿 C. W. Greider 1999, J. D. Griffith, 等, 1999)

bp单一序列的串连重复。如四膜虫(*Tetrahymena*)为$(TTGGGG)_n$,人和哺乳动物为$(TTAGGG)_n$。重复序列的数目 n 在不同物种间不同,如线虫 $n=2\sim3$,高等脊椎动物 n 可高达数千,同一物种细胞不同染色体之间 n 也有差异。人类细胞 $n=500\sim2\,000$,端粒长度约 4～6 kb,啮齿类约为 40～60 kb。有些物种具有不规则的重复序列,如酵母为 $TG_{1\sim3}$(G 的数目为 1～3 个),草履虫为 TTGGG 和 TTTGGG 沿端粒分散存在。大部分机体染色体端粒重复数目不固定,重复序列的长度从几十个 bp 到几千个 kb,哺乳动物细胞每个机体有其特征性的平均长度。端粒结合序列(TAS)位于端粒重复序列和第 1 个单一拷贝基因之间,由几个～几百个 bp 的中度重复序列和穿插于其中的短的卫星样重复序列构成(图 7－20A)。

染色体 DNA 的 3′端突出结构如何区别于 DNA 随机断裂端? 主要通过端粒重复因子(telomeric repeat factors, TRF),目前已分离出 2 种人类 TRF(TRF1 和 TRF2),有保护染色体末端的作用,其机制如图 7－20B:TRF1 形成同源二聚体与端粒 TTAGGG 序列结合,在 TRF1 和 TRF2 协助下染色体末端发生回折,将 3′突出端插入上游含端粒序列的区域,并与另一条链的端粒序列形成取代互补结构,称其为 D 环(displacement loop),仅含端粒序列的几百个碱基,由这种末端回折形成的外环,包含了几乎全部端粒部分,其大小与端粒长度一致,称其为 T 环(telomeric loop)。这种末端回折结构在染色体超微结构 PCC 电镜照片(图 7－16C)中也得到了证实。由于 DNA 末端环状结构,染色体 3′突出端受到保护。如果染色体缺失 TRF2 则导致染色体结构和数量变异,染色体末端粘连,细胞衰老或程序性死亡。

染色体端粒重复序列的长度在许多真核细胞是通过端粒酶(telomerase)维持。端粒酶是一种核糖核蛋白,其核心成分为模板 RNA(TR)和反转录酶(TERT)二部分组成。端粒酶的功能在于以 TR 为模板,进行反转录补齐染色体末端丢失的端粒序列,其作用机制如图 7－20C:首先 DNA 链 3′突出端最末 3 个碱基与 TR 的 3 个相应的碱基配对,经 TERT 的催化以 TR 为模板延伸 DNA 链,再通过 DNA 聚合酶完成后随链的合成以维持染色体端粒序列的长度。

近几年关于端粒和端粒酶的研究,进展十分迅速。已有大量的实验证明,端粒酶活性与端粒长度、端粒长度与细胞增殖能力,与细胞寿命以及与癌细胞的相关性。如人类的 hTR 基因广泛表达于各种组织细胞,hTERT 基因的表达决定了细胞端粒酶是否被激活,研究表明,生殖细胞始终保持端粒酶的活性,这对物种延续至关重要。胚胎发育早期干细胞维持端粒酶活性,随着发育进行组织分化开始,活性被抑制,在大多数体细胞中 TERT 不表达,人和其他动物一般体细胞端粒酶多无活性。在永生不死的(immotal)单细胞生物,具有无限增殖能力的癌细胞,端粒酶有活性,端粒的长度不缩短,在培养的细胞,随着每次细胞分裂端粒缩短,细胞衰老,不再增殖。但在有限寿命(一般在 50 代左右)的培养细胞,通过转染(transfection)端粒酶基因,则能成倍地增加其寿命,同时也发现具长端粒的细胞比具短端粒的细胞分裂次数多。在体内一般组织的端粒,老年人的比年轻人的短。基于上述的各方面的工作结果,有些学者认为端粒缩短可能是进入开始衰老(senescence)信号的检测点(checkpoint),也有认为端粒是寿命的标志。在美国现已开始用端粒检测盒(telomere detection kit)探查寿命。

7.3.3 染色体 DNA 的关键序列和人工染色体

染色体在细胞世代中能稳定地从这一细胞世代传到下一代,起码需具备 3 种基本结构

(图 7-21):即一个 DNA 复制起点,使染色体能自我复制、维持其遗传的连续性;一个着丝粒,使复制的染色体在细胞分裂时平均分配到两个子细胞中;还有,在染色体两端需要有端粒,使 DNA 能完成复制,并能维持染色体的独立性和稳定性。构成染色体 DNA 的这 3 种结构序列称为染色体 DNA 的关键序列(key sequence)。采用分子克隆技术,可将真核细胞染色体的复制起点、着丝粒和端粒这 3 种 DNA 关键序列分别克隆出来,再将它们互相搭配连接构成人工染色体(artificial chromosome),或称人工微小染色体(artificial minichromosome)。

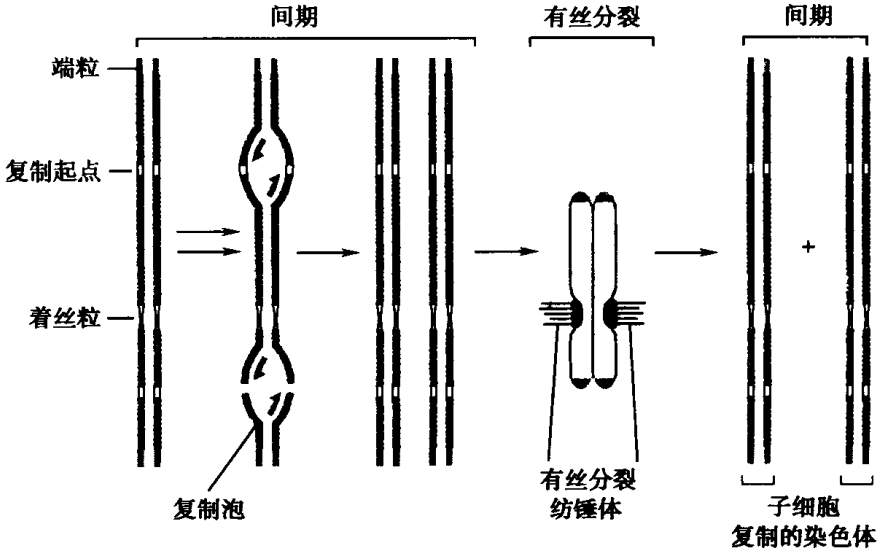


图 7-21 真核细胞染色体 3 种 DNA 序列基本结构成分及其功能示意图

7.3.3.1 染色体 DNA 的关键序列

1.DNA 复制起始序列(DNA replication origin sequence)或称自主复制 DNA 序列(autonomously replicating sequence, ARS)

应用 DNA 重组技术,将酵母的 DNA 片段(含遗传标记)重组到大肠杆菌的质粒中,以此重组质粒去转化酵母细胞,结果,重组质粒能在酵母细胞中复制、表达,而单纯的质粒则不能转化酵母细胞。这说明酵母 DNA 片段除具遗传标记的基因外,还含有酵母染色体 DNA 复制起始序列(或称 ARS),该序列首先在与酵母 Trp1 基因连锁的 DNA 序列中被发现,它能使重组质粒高效表达,也能在酵母细胞中独立存在。对不同来源的 ARS 序列进行分析,发现它们都具有一段 11~14 bp 同源性很强的富含 AT 的序列,此序列及其上下游各约 200 bp 的区域对维持 ARS 的功能有意义。大部分真核细胞的染色体具有许多 DNA 复制起始序列,使整个染色体能迅速地复制。

2. 着丝粒 DNA 序列(centromere DNA sequence, CEN)

上述的带有 DNA 复制起始序列的重组质粒(即 ARS 重组质粒),在酵母细胞中虽能复制和表达,但是不能在细胞分裂时平均分配到子细胞中,这是由于没有着丝粒。如果将酵母染色体着丝粒 DNA 序列再插入到这个 ARS 重组质粒中,结果这种新的重组质粒便能表现出正常染色体的行为——复制后进行分离。对不同来源的 CEN 序列分析结果表明,它们的共同特点是,都有两个彼此相邻的核心区:80~90 bp 的 AT 区和 11 bp 的保守区。如果一

旦伤及这两个核心区序列，CEN 便失去其功能。

3．端粒 DNA 序列(telomere DNA sequercce, TEL)

上述插入 ARS 和 CEN 序列的重组质粒为环形的 DNA，在酵母细胞中能进行复制和分离。如果在一个位点上将该重组质粒切开，形成一个具有两个游离端的线性 DNA 分子，虽可在酵母细胞中复制并可附于有丝分裂的纺锤体上，不过最终要从子细胞中丢失。这是由于线性 DNA 分子的两游离端没有端粒 DNA 序列，无法解决 DNA 末端复制问题。如果将插有 ARS 和 CEN 序列的重组质粒在一个位点切成线性 DNA 分子后，在其两端接上四膜虫的 TEL 序列，则该线性质粒就能在酵母细胞中正常地进行复制、分离，并具有稳定性。

7.3.3.2　人工染色体

DNA 复制起始序列、着丝粒序列和端粒序列是构成染色体不可缺少的最基本的 3 个关键序列。现在人们已经成功地将酵母染色体的着丝粒序列、DNA 复制起始序列与四膜虫端粒序列拼接起来，再导入酵母细胞，成为人工染色体或称酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YAC)。这种人工染色体 DNA 大于 300 kb 时，能正常地在子代细胞间进行精确地分配，犹如天然的染色体；而较小的人工染色体常不能精确地分配，可能由于较小的染色体复制太快，子代染色体分离过早，不能在纺锤体上正确排列所致。YAC 用作为载体，可以克隆大片段的 DNA 分子(图 7－22)。

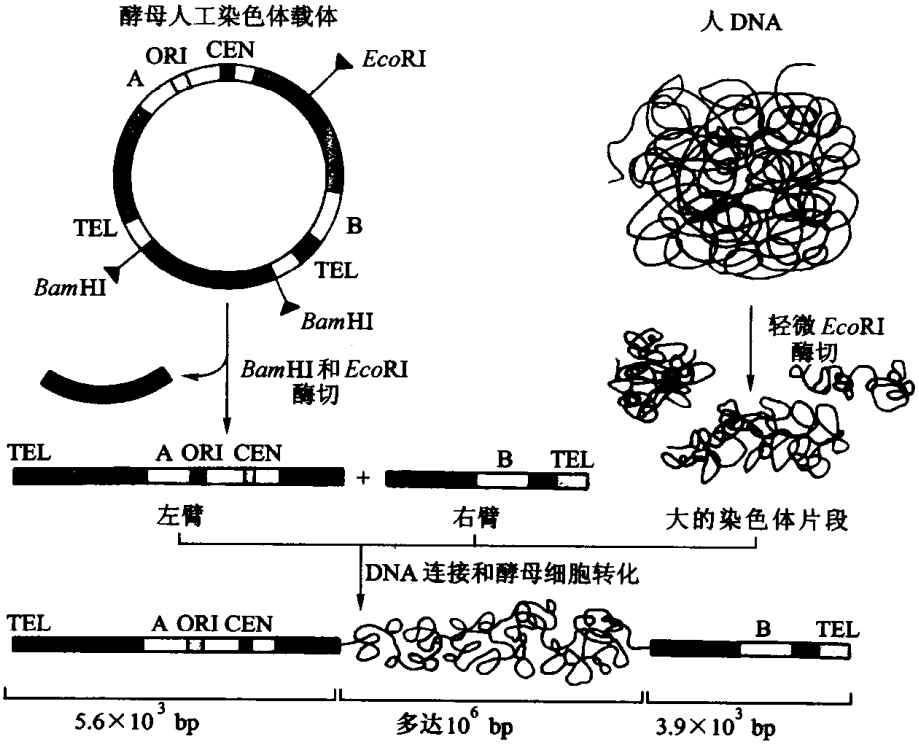


图 7－22　构建的酵母人工染色体(YAC)作为载体克隆人的大片段 DNA 示意图
TEL、CEN 和 ORI 分别为端粒、着丝粒和复制起点，*Bam*HI 和 *Eco*RI 为限制性核酸酶切 DNA 双螺旋的位点。A 和 B 表示编码酶序列作为选择标志，便于分离已接纳人工染色体的酵母细胞(仿 D. T. Burke, 等)

7.3.4 核型和染色体带型

由于染色体是遗传信息的载体，它对细胞以至生物的生长、发育、遗传、进化都有重要作用。在生命科学的很多学科领域，如细胞、遗传、发育、进化、分类、育种、遗传工程、临床医学、优生以及环境科学等都不同程度地涉及、应用染色体的知识。通过染色体研究各个领域的有关问题时，都需要将中期分裂相的染色体制成核型或显示出带型，加以分析。因此核型与带型是作染色体研究的基础工作。

将细胞分裂中期的染色体，按着染色体着丝粒的位置和相对长度分组排列所构成的图像，称为该细胞的核型(karyotype)或称染色体组型。通常是将显微摄影得到的染色体照片剪贴、分组排列、测量统计而成。由于染色体的长度随其包装紧密程度不同而异，因此一般论及染色体的长短是指其相对长度(relative length)，即该染色体长度占整套单倍染色体组总长的百分数。如果将核型一个染色体组的全部染色体逐个按其形态特征绘制下来所成的图象称为核型模式图(idiogram)，它代表一个物种的核型模式。

核型分析主要是根据染色体的形态特征——着丝粒位置和相对长度进行的。但有时对染色体仍不易精确地识别和区分，也难以再进行深入研究。1968 年瑞典学者 Casperson 及其同事首先应用荧光染料氮芥喹吖因(quinacrine mustard)处理染色体标本，在荧光显微镜下发现每条染色体沿其长轴出现宽窄和亮度不同的带纹，是为荧光带，而且每条染色体有其独特的带型(banding pattern)。通过带型可清楚地识别每条染色体，这样显带技术为深入研究染色体异常和基因定位等提供了基础，从此发展了多种显带技术。

用喹吖因显带的方法称为 Q 显带，显示的带纹称为 Q 带。如将染色体标本用热、碱、各种蛋白酶(如胰酶)、尿素、去垢剂及某些盐溶液处理，再用吉姆萨(Giemsa)染色，可显示与 Q 带相似的带纹。由于用 Giemsa 最后染色，这类显带技术称为 G 带(图 7－23)。如改变盐溶

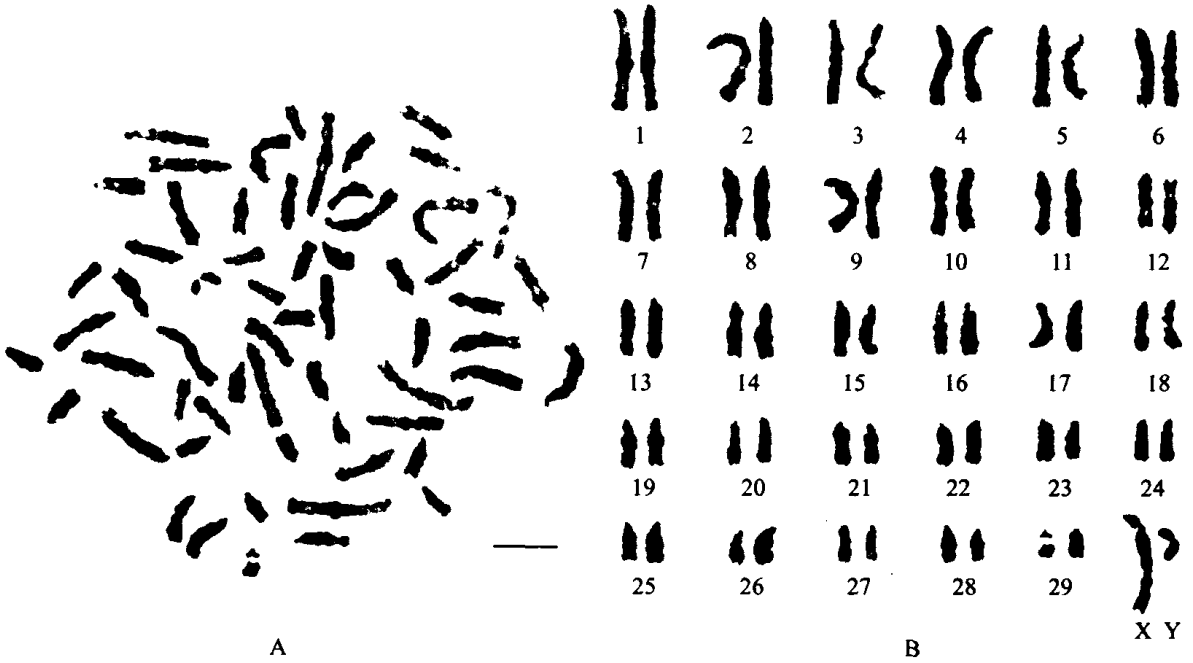
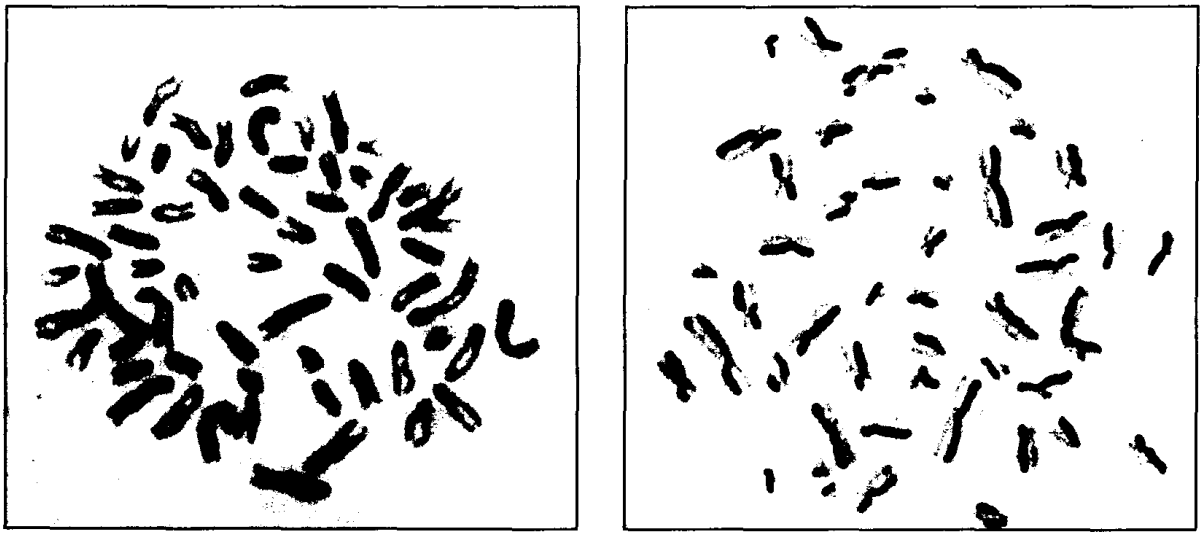


图 7－23 染色体 G 带带型

A. 北京黑白花奶牛的培养淋巴细胞 G 带染色体分裂相照片；B. 同一分裂相的染色体 G 带带型(自刘凌云，等)

液处理的温度和时间,可得到与 G 带深浅带纹相反的带型称为 R 带(reverse bands)。还有专门显示着丝粒结构异染色质的 C 带、显示染色体的核仁组织区的 N 带和显示端粒的 T 带,以及显示姊妹染色单体交换的 BG 带等(图 7－24)。



A B

图 7－24 染色体显带的分裂相照片

A. 北京黑白花奶牛的培养淋巴细胞染色体显示其结构异染色质 C 带照片(自刘凌云,等);B. 人(男性)淋巴细胞染色体,用 BrdU 掺入两个细胞周期所显示的姊妹染色单体差别染色(SCD)及姊妹染色单体交换(SCE)照片(此人吸烟故 SCE 较多)(自刘凌云)

Q 带和 G 带是一致的,Q 带的亮带正是 G 带的深染带;Q 带的暗带恰是 G 带的浅染带。已经实验证明,G 带染色体上的深染带富含 AT,浅染带富含 GC,而且染色体上的每条带纹在 S 期都有它自己的复制时间。总的看,G 带的浅染带复制早于深染带复制的时间。因此如果将 BrdU 掺入到培养细胞的早 S 期,可获得 G 带,如果掺入到晚 S 期可得到 R 带。如果掺入两个细胞周期则可得到 BG 带(SCD)(图 7－24B)。用大剂量的 BrdU 处理培养细胞可获得高分辨 G 带或 R 带。1976 年 Yunis 等建立了人类染色体高分辨显带技术,获得大量晚前期和早中期分裂相,染色体上显示出更多更细的带纹,可分辨出高达 1 256 条带纹(一般中期染色体能观察到 320～550 条带)。这对发现染色体微细的异常,对人类遗传病和癌症的诊断、优生的检查以及基因定位等都有重要意义,并已应用于实践。而且应用计算机图像自动分析系统,根据染色体的大小、着丝粒位置和 G 带带型的灰度值的变化,能够全自动或半自动地对分裂相的染色体进行分组排队作出核型及 G 带带型,并能找出异常的染色体。

核型和染色体带型具有种属特异性。染色体标准带型与核型是一个物种在进化上稳定的特征,特别是染色体带型在应用上具有更高的准确性。由于带型能鉴别染色体组中每条染色体,乃至染色体上某一区带的变化,因此,通过核型与带型分析,可研究一些物种的分类和进化,以及研究遗传变异进行杂交育种,并应用染色体畸变和 BG 带所显示的 SCE(姊妹染色单体交换)作为手段和指标检测环境中的致变致癌物和筛选抗致变致癌物。

7.3.5 巨型染色体

顾名思意,巨型染色体(giant chromosome)是由于它比一般染色体巨大而得名。这类染

色体包括多线染色体和灯刷染色体。

7.3.5.1 多线染色体

多线染色体(polytene chromosome)又称为唾腺染色体,是由 Balbiani(1881)首先在双翅目昆虫摇蚊(*Chironomus*)幼虫的唾液腺细胞中发现的,它不仅存在于唾腺中,也存在于大多数双翅目昆虫的前肠、中肠和马氏管的细胞内,还见于原生动物纤毛虫类的棘尾虫(*Stylonichia mytilus*)的大核内,在植物俯垂葱(*Allium nutans*)的助细胞和反足细胞核中也发现了多线染色体。

为什么能形成这种巨型的多线染色体?这是由于具有多线染色体的这类细胞能进行核内有丝分裂(endomitosis),通过多次细胞周期,染色质 DNA 复制多次,复制后不分离;唾腺等这类已分化的细胞,不再进行分裂,复制后的子染色体不能分配到子细胞中,且有序地并行排列;又由于体细胞同源染色体配对紧密贴近,每条染色质股精确对应并行排成一行,因而形成具多条染色质纤维又粗又长的大染色体(图 7-25)。染色体可达几百 μm 长几 μm 粗(对比正常昆虫体细胞的染色体只几个 μm 长不到 1 μm 粗)。可以说多线染色体是处在

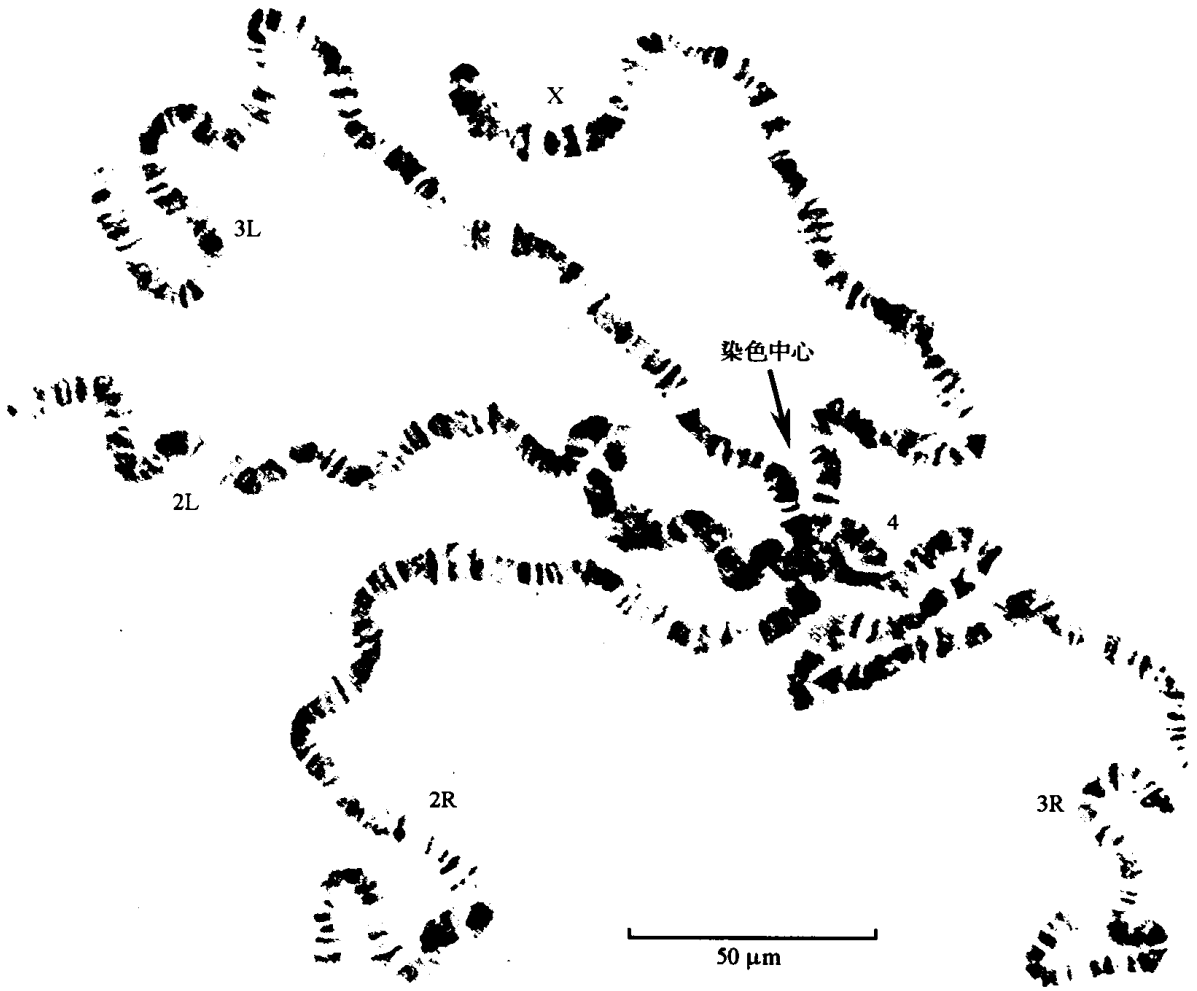


图 7-25 果蝇唾腺细胞的多线染色体

压片法制备染色体,4 对同源染色体各自紧密配对,成为 4 条多线染色体,在着丝粒区连接、聚集形成大的染色中心(引自 T.S.Painter)

细胞分裂的前期阶段，是永久性前期中的一种体细胞配对。

对果蝇幼虫唾腺染色体是研究最多也最深入。已知果蝇有 4 对染色体，在唾腺同源染色体配对成为 4 条多线染色体。每条通过 10 个细胞周期复制而未分开，结果形成1 024(2^{10})条相同的染色质纤维并行排成一列。在光镜下观察多线染色体，可见每条(同源)染色体上有一系列交替分布的带(band)和间带(interband)(图 7－25)。每个带和间带代表着一套 1 024个相同 DNA 序列。在多线染色体带内约分布有 85%DNA，在间带约分布 15%DNA。因此每条带为深染，间带为浅染。从结构看每条带代表由 1 024 条并行排列的染色质纤维形成的环状结构彼此对应包装而成(图 7－26A)。在全部基因组中约有 5 000 条带和 5 000 条间带。每条染色质纤维的带区各个带根据其大小估计约含 3 000～300 000 bp。多线染色体上带的形态、大小及分布都相当稳定，每条带能按其宽窄和间隔予以识别，并给以标号，由此得到了多线染色体(带型)图(polytene chromosome map)。

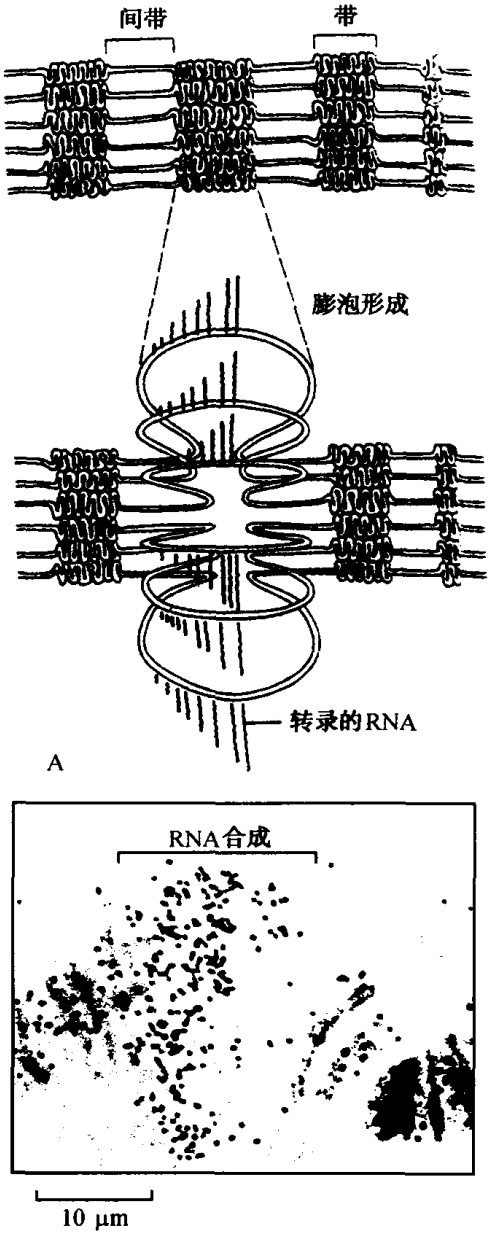


图 7－26　多线染色体的膨泡形成和 RNA 转录

A. 示意图；B. 单个膨泡用^{3}H－Uridine 标记放射自显影照片，表明活跃的 RNA 转录(A 引自 B. Alberts, 等；B 自 Jose Bonner)

过去认为果蝇多线染色体一条带含有一个基因，一个基因编码一种蛋白，以后的实验表明，从果蝇基因组中克隆出 315 000 连续的核苷酸序列，并以此 DNA 序列为探针，检测该段 DNA 所转录的 mRNA，结果发现 mRNA 比带纹数多 3 倍。说明每条带可能含有几个基因。而且已直接显示 mRNA 在多线染色体是从带和间带产生的。一般多线染色体具有转录活性的带区常变得疏松膨大形成膨泡(puff，或称膨松区或胀泡)，最大的膨泡称为 Balbiani 环。如用^{3}H－尿嘧啶核苷掺入细胞，用放射自显影定位生长的 RNA 的转录，结果膨泡被标记(图 7－26B)。说明膨泡是基因活跃转录的形态标志，分析显示，大部分具转录活性的区域是去浓缩的，并形成明显的膨泡。当机体从发育的一个阶段向另一阶段进行时，新的膨泡出现，老的膨泡缩回。一定的膨泡在发育的一定时间出现和消失，即当转录单位被激活或去活性，则产生不同的 mRNA 和蛋白质。电镜观察膨泡的薄切片表明，在该处的染色质比 30 nm 染色质纤维浓缩得更少。这些观察也表明染色质的带能去浓缩作为转录的一个单位。

7.3.5.2　灯刷染色体

灯刷染色体(lampbrush chromosome)由 W. Flemming 在 1882 年首次报道，但未肯定它

是一种染色体。1892 年 J. Rückert 研究鲨鱼卵母细胞中这种染色体的结构时，因其形状酷似欧洲当时擦洗煤油灯罩的灯刷，故命名为灯刷染色体。灯刷染色体在生物界分布较为广泛，脊椎动物几乎各纲都有分布，无椎脊动物的软体动物、甲壳类、大多数昆虫、毛颚类、棘皮动物等也存在有灯刷染色体。大多数动物的灯刷染色体出现在卵母细胞第一次减数分裂的双线期，还有些动物灯刷染色体出现在精母细胞减数分裂的前期，如多种直翅目和双翅目昆虫、部分两栖类以及猕猴等哺乳动物，在植物界也有发现，如一种大型单细胞藻——地中海伞藻(*Acetabularia mediterranea*)有典型的灯刷染色体，高等植物如玉米、垂花葱(*Alliun cernuum*)在雄性配子减数分裂中出现不典型的灯刷染色体。

不同物种的灯刷染色体大小形态均有差异。其中两栖类动物的灯刷染色体最为典型，研究得也最为详尽、深入。两栖类卵母细胞第一次减数分裂时停留在双线期的染色体为二价体，两条同源染色体已经复制，因此它含有 4 条染色单体。双线期染色体的主要特点是交叉(chiasma)现象明显，常可见两同源染色体间有几处交叉(图 7－27)。这一时期在卵母细胞中能持续数月或数年之久。

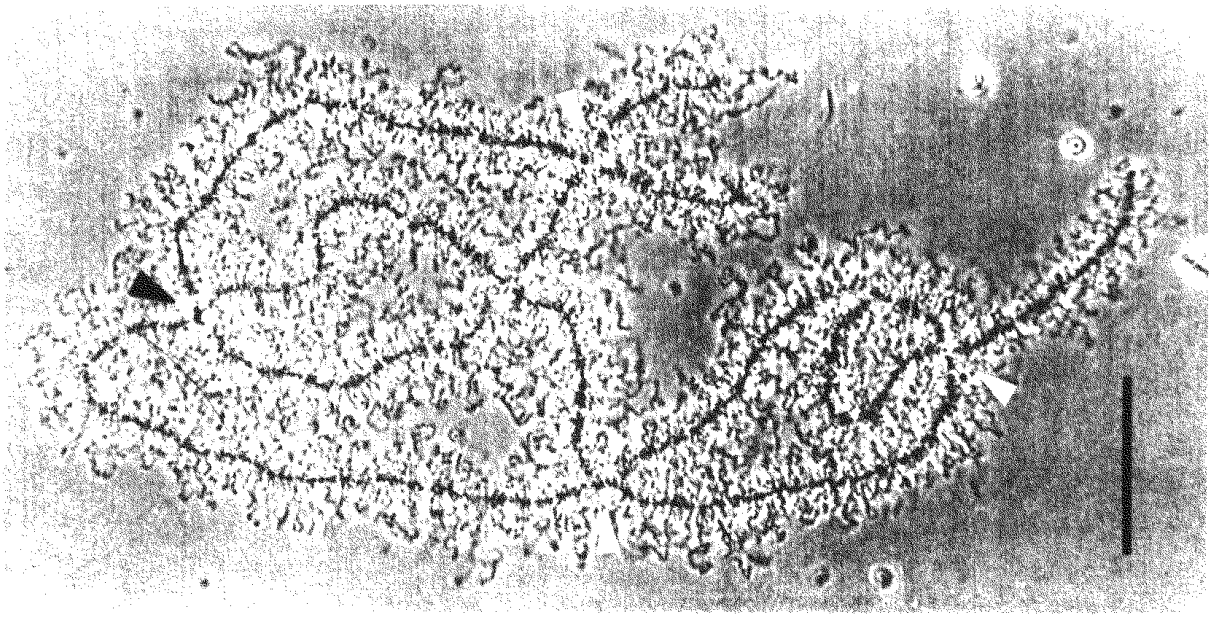


图 7－27 两栖类动物 *Notophthalmus viridescens* 卵母细胞中灯刷染色体相差显微照片(×460)
可见从线形的染色体轴上伸出一系列的染色质环，并可见有 3 个交叉(白箭头所示)及着丝粒(黑箭头所示)。标尺 = 50 μm(引自 Joseph G. Gall)

每条染色单体由一条染色质纤维构成，构成灯刷染色体的染色质纤维分化为染色体轴和侧环(图 7－28)。在染色体轴，由染色质纤维紧密包装形成一系列的具一定间隔的染色粒(chromomere)，染色粒之间的纤维称为轴丝。一个染色粒上通常向两侧伸出两个相类似的侧环，也有染色粒伸出几个侧环。大部分 DNA 存在于染色粒中，没有转录活性，侧环是 RNA 转录活跃的区域。一个侧环是一个大的转录单位，有的是几个转录单位的组合。已经核酸杂交实验显示，一定的侧环总是包含相同的 DNA 序列。染色粒的数目和大小不仅与物种有关，也随着侧环转录活性而变化。一般年轻的卵母细胞中，由于侧环转录活性高，染色粒较小，数目较多；随着卵母细胞的成熟，侧环转录活性逐步降低，侧环回缩，染色粒也彼

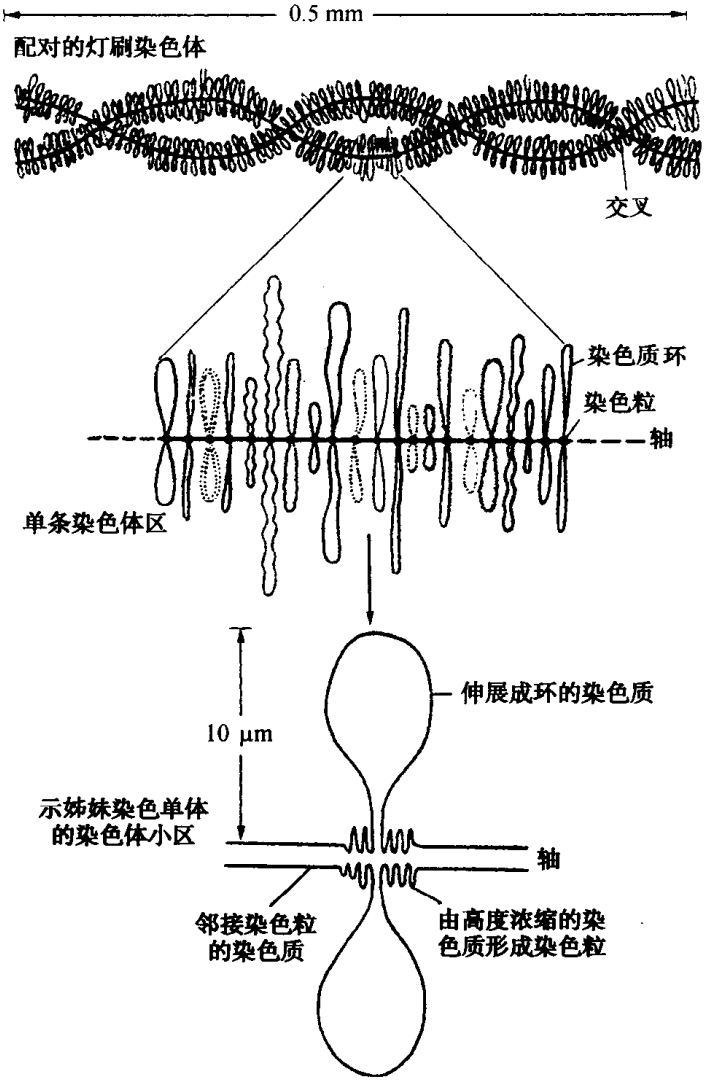


图 7－28　灯刷染色体的结构
许多两栖动物灯刷染色体组包含约 10 000个染色质环，每条染色体大部分染色质呈高度浓缩的染色粒，每个环相当于特异的 DNA 序列，在每个细胞中每个环有 4 个拷贝，两同源染色体的每一个是由紧密相对的姊妹染色单体组成。4 股结构（4 条染色单体）是减数分裂双线期卵母细胞发育的一个特征（自 B. Alberts, 等）

此逐渐融合，数量变少，最后成为一条无法辨认染色粒的染色体轴。卵母细胞发育所需要的全部 mRNA 和蛋白等都是从灯刷染色体转录下来合成的。

7.4　核　仁

在光学显微镜下，核仁通常是匀质的球形小体，一般有 1～2 个，但也有多个。核仁（nucleolus）是真核细胞间期核中最明显的结构。核仁的大小、形状、数目随生物的种类、细胞形状和生理状态而异，蛋白质合成能力旺盛的卵母细胞和分泌细胞，核仁很大；但不具蛋白质合成能力的细胞（如肌肉细胞、休眠的植物细胞等）核仁很小，说明核仁与蛋白质合成密切相关。核仁中主要含蛋白质，为核仁干重的 80% 左右；RNA 为核仁干重 10% 左右；DNA 含量较 RNA 少；脂类含量极少。

7.4.1　核仁的超微结构

在电镜下显示出的核仁超微结构与胞质中大多数细胞器不同，在核仁周围没有界膜包围，可识别出有 3 个特征性区域：纤维中心、致密纤维组分、颗粒组分（图 7－29）。

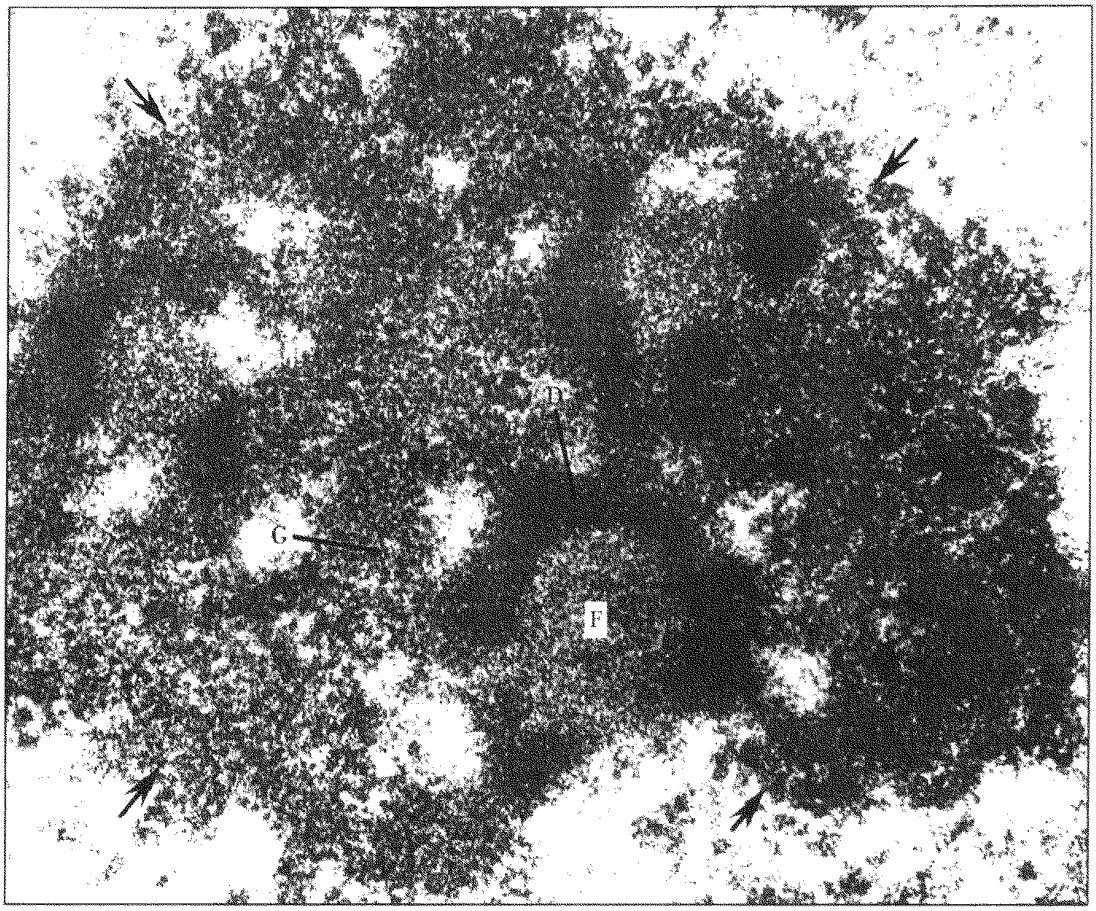


图 7－29 人阴道上皮细胞核仁电镜照片

示 3 个特征性区域。F:纤维中心;D:致密纤维组分;G:颗粒组分;图中箭头表明核仁的区域

1. 纤维中心(fibrillar centers, FC)

在电镜下,纤维中心是被密集的纤维成分不同程度地包围着的浅染的低电子密度区域,通过电镜细胞化学和放射自显影实验表明,纤维中心存在具有 rDNA 性质的 DNA。有人认为这些 DNA 不处于转录活性状态。

2. 致密纤维组分(dense fibrillar component, DFC)

在电镜下显示出,致密纤维组分是核仁中电子密度最高的部分,染色深,它由致密纤维组成,包围纤维中心,通常见不到颗粒。通过带放射性的 RNA 前体物的脉冲标记和电镜放射自显影观察及电镜原位分子杂交等实验表明,DFC 是 rDNA 进行合成 rRNA 并进行加工的区域,在该区存在一些特异性的结合蛋白,如 fibrilarin, 核仁素(nucleolin)等。核仁素之存在,使核仁能被特征性地银染。

3. 颗粒组分(granular component, GC)

该区域由电子密度较高的、直径为 15～20 nm 的核糖核蛋白(RNP)颗粒构成,代表着正在加工、处于不同成熟阶段的核蛋白体亚单位的前体颗粒。

除了上述 3 种基本核仁组分外,核仁被一些染色质包围,称为核仁相连染色质(nucleolar－associated chromatin):一部分是包围在核仁周围的染色质,称为核仁周边染色质(perinucleolar chromatin),另一部分是伸入到核仁内的染色质,称为核仁内染色质(intranucleolar chromatin),此外,还存在一种无定性的被称为核仁基质(nucleolar matrix)成

分。上述 3 种特征性区域存在于核仁基质中。虽然核仁 3 种特征性区域的结构和它们以某种方式与 rRNA 的转录和加工有关的特性已被人们所共识。但是有关 rRNA 基因转录的确切位点仍存在争议。通常认为 FC 区域是 rDNA 储存位点，DFC(也有人认为 FC 与 DFC 的交界处)是 rDNA 进行转录的位点，GC 区域是核蛋白体亚单位成熟和储存位点；而 rRNA 前体的加工在 DFC 区域中进行，某些加工程序也发生在 GC 区域中。但现在也提出不同看法，如有人认为纤维中心(FC)和颗粒部分(GC)也都可能存在 rRNA 基因转录位点。

7.4.2 核仁周期

在细胞周期过程中，核仁是一个高度动态的结构。在有丝分裂过程中其形态和功能上发生了一系列变化(图 7－30)。当细胞进入有丝分裂时，核仁变形和变小，然后染色质凝集和停止 RNA 合成，核膜破裂进入中期，核仁消失；进入有丝分裂末期，核仁组织区 DNA 解凝聚，重新开始 rRNA 合成，极小的核仁重新出现在染色体核仁组织区附近，而重现的核仁物质可能由一些小的核仁前体物聚集而来。在重建核仁的过程中，原有的核仁组分可能起协助作用。此外，近年来实验表明，在重建过程中也需要有 rRNA 基因的活性。核仁的再次出现与一些特殊染色体(核仁染色体)上存在的含有 rRNA 基因的核仁组织区(nucleolar organizer region，NOR)密切相关。核仁从核仁组织区部位产生，并与其紧密相连；对人来说，有 5 对染色体上存在 NOR，通过实验可见在一个大的核仁中包含有从 5 对染色体上来的染色质环，这些环上含有 rRNA 基因(rDNA)(图 7－31)。

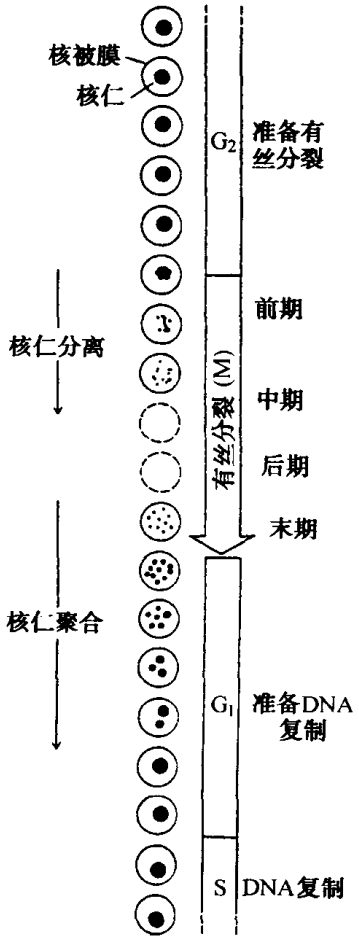


图 7－30 人的细胞周期不同时相中核仁的变化图解

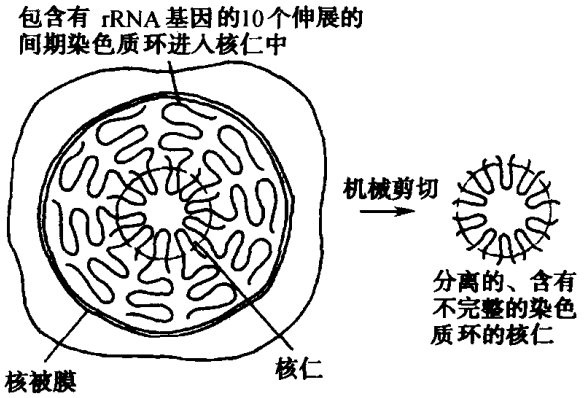


图 7－31 人细胞中 10 个核仁染色体上的环延伸入核仁，形成核仁中的染色质环示意图(引自 B. Alberts)

7.4.3 核仁的功能——核蛋白体的生物发生

核蛋白体(又称为核糖体，ribosome)的生物发生包含 rRNA 的合成、加工和核蛋白体亚单位的装配等过程。核仁是进行上述过程的重要场所。

7.4.3.1 rRNA 基因的转录及其特征

实验表明，rRNA 基因(rDNA)定位在核仁组织区，该区域的基因编码 18S、28S 和 5.8S

rRNA。通过实验表明,缺失核仁组织区(无核仁)的非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)纯合突变型是致死的,胚胎发育一个星期后即死亡。因为它不能合成 rRNA 和形成核蛋白体。

已知几乎在所有的细胞中均含有多拷贝的编码 rRNA 的基因。如人细胞在每个单倍体基因组上包含有 200 多个 rRNA 基因拷贝;野生型非洲爪蟾每个单倍体基因组上包含有更多的 rRNA 基因拷贝(450～600 个)。但在非洲爪蟾卵母细胞中,因生理需要更多的核蛋白体供给胚胎发育早期需要,故通过基因扩增(amplification)现象,rRNA 基因可被扩增 1 000 倍以上。rDNA 拷贝数可达 2 百万个。这些多拷贝的基因呈串状重复排列,每个基因之间为不被转录的间隔 DNA(spacer DNA)分开。间隔 DNA 的长度和序列随生物种类不同而异。在一定的实验处理条件下,这个呈串状排列的 rRNA 基因可在铺展的染色体电镜制备标本中观察到。Miller 等(1969)通过对非洲爪蟾卵母细胞的实验,首先在电镜标本中观察到由 rRNA 基因转录成 rRNA 的形态学过程。以后在其他细胞中也得到类似的结果。在处理后的电镜标本中见到核仁的核心部分由纠缠在一起的一根长 DNA 纤维组成(图 7－32)。新生的 RNA 链从 DNA 长轴两侧垂直伸展出来,而且是从一端到另一端有规律地增长,构成箭头状,外形似圣诞树(Christmas tree),沿 DNA 长纤维有一系列重复的箭头状结构单位,每个箭头状结构代表是 rRNA 基因转录单位,在箭头状结构间存在着裸露的不被转录的 DNA 间隔片断。由图可见,在 DNA 长轴纤维和 RNA 纤维相连接部位存在颗粒,即 RNA 聚合酶Ⅰ,它们一边读码一边沿 DNA 分子移动,结果使转录合成中的 RNA 逐渐加长,最终形成一个 18S、5.8S 和 28S rRNA 前体分子。

鉴于 rRNA 在核蛋白体生物发生中的重要作用,rRNA 基因拷贝数随细胞种类和生理需求表现出很大差异,正如前述,非洲爪蟾卵母细胞可通过 rDNA 扩增,转录合成更多的

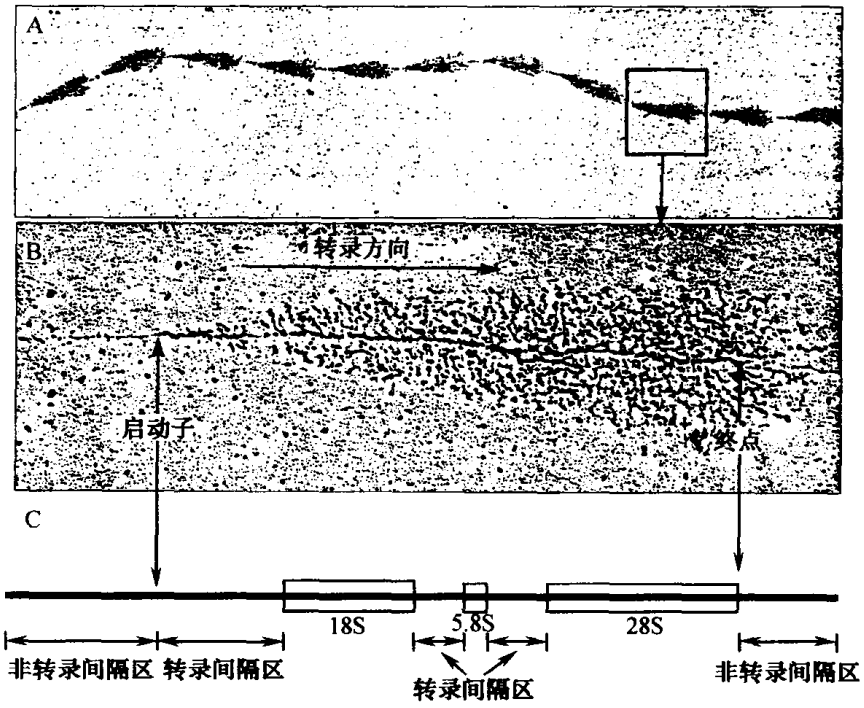


图 7－32 rRNA 基因呈串状重复排列及 rRNA 基因转录单位放大图

A. 一个核仁组织区(NOR)铺展的电镜标本,可见 11 个转录单位; B. 一个 rRNA 基因转录单位放大图; C. 一个 rDNA 单位的基因图谱示意图(引自 De Rebertis)

rRNA 和贮备大量核蛋白体，以供胚胎早期发育的要求。

7.4.3.2 rRNA 在核仁中的加工成熟过程

每个 rRNA 基因转录单位在 RNA 聚合酶 I 作用下产生原初转录产物 rRNA 前体。但是在不同细胞中 rRNA 前体和最终被剪切分子在大小上是不同的。如哺乳动物 rRNA 前体为 45S，酵母的 rRNA 前体为 37S。大肠杆菌 rRNA 前体为 30S。此外，真核生物 rRNA 前体中含有 5.8S rRNA。

以哺乳动物为例，从前体 45S rRNA 剪切为 28S 和 18S rRNA 是一个多步骤的复杂加工过程(图 7－33)。运用放射性标记的 rRNA 前身物 ^{3}H－尿嘧啶核苷对培养的 HeLa 细胞脉冲标记后，可通过凝胶电泳等方法分离到 45S rRNA 前体及其加工后产物。实验表明，rRNA 前体 45S(约 13 kb)约在几分钟内合成，在核仁中 45S rRNA 很快被甲基化，然后 45S rRNA 分裂为较小的组分约 41S、32S 和 20S 等中间产物，20S 很快裂解为 18S rRNA，迅速被释放至细胞质中。32S 中间产物保留在核仁颗粒组分并被剪切为 28S 和 5.8S rRNA。5.8S rRNA 和 28S rRNA 间具有较长的互补氢键配对。不难看出，rRNA 前体的加工成熟过程中显示出它们在核仁中存在区域性转移的过程，即前体从 rDNA 上被转录后可能首先出现在致密纤维组分，以后进行加工剪切后的中间产物相继出现在颗粒组分。实验表明，rRNA 前体的甲基化基团在加工过程中是必需的。现已知在 rRNA 前体加工成熟过程中需要小分子细胞核仁 RNA 的催化，它们被命名为 snoRNAs (small nucleolar RNAs)，如 U3 snoRNA 等。它们与蛋白质结合形成小的核糖核蛋白颗粒 snoRNPs。一些 snoRNA 对于 rRNA 前体加工成熟过程是必需的。

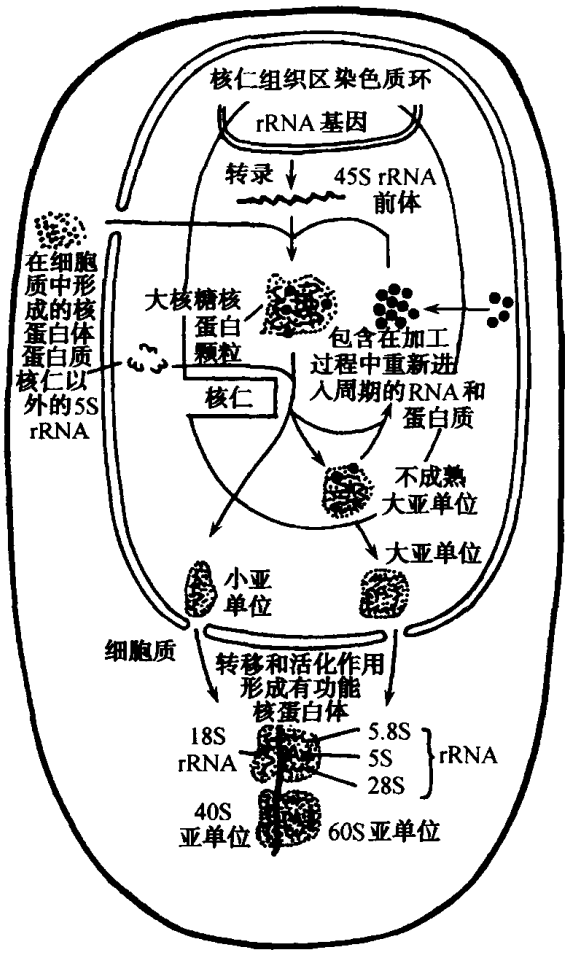


图 7－33 核仁在核蛋白体合成与组装中的作用

近年来发现在 rDNA 中相应于 26～28S rRNA 的区域有内含子(intron)，首先在四膜虫中发现，以后相继在其他生物(如酵母等)中也被证实。从 rRNA 前体加工至 26～28S rRNA 过程中，该内含子序列被一种独特的称为自我剪接(self－splicing)机制切除。该 rRNA 的剪接是依赖于相应于内含子的具有“自我催化”能力的 RNA 序列自身的性质来完成的。

7.4.3.3 核蛋白体亚单位的组装

实验表明，45S rRNA 前体被转录后很快与蛋白质结合。在细胞内 rRNA 前体的加工成熟过程是以核蛋白方式进行的。45S rRNA 前体被转录后很快与进

入核仁的蛋白质结合形成约 80S 的核糖核蛋白颗粒(RNP)。在加工过程中,该颗粒逐渐丢失一些 RNA 和蛋白质,形成两种大小不同的核蛋白体亚单位前体,最后在核仁中形成大、小亚单位被输送到细胞质中(图 7－33)。放射性脉冲标记和示踪实验表明,首先成熟的核蛋白体小亚单位(含 18S rRNA)出现在细胞质中,而核蛋白体大亚单位的组装(包含 28S、5.8S 和 5S rRNA)则完成较晚。因此在核仁中包含较多的未成熟的核蛋白体大亚单位。其他被加工下来的蛋白质和小的 RNA 分子留在核仁中,可能起着催化核蛋白体构建的作用。

一般认为,核蛋白体的成熟作用仅发生在它们的亚单位被转移到细胞质以后,这两个亚单位只有当它们分别地通过核孔进入细胞质中,才能形成功能单位。这可能与阻止有功能的核蛋白体与细胞核中加工不完全的 hnRNA 发生作用有关。

在真核细胞中,参与核蛋白体组装的 5S rRNA 和大多数 rRNA 基因编码的位置不同,通过原位杂交实验表明,编码 5S rRNA 的基因并不定位在核仁上。在非洲爪蟾中,5S rRNA 基因定位在大多数染色体的端粒区;在果蝇中,5S rRNA 基因定位在常染色体上。真核生物中,5S rRNA 基因呈串状重复排列,被 DNA 间隔片段隔开。在 RNA 聚合酶Ⅲ作用下 5S rDNA 被转录为 5S rRNA。5S rRNA 在细胞核染色体上合成后被转运至核仁中参与核蛋白体大亚单位的组装(图 7－33)。

7.5 核基质(核骨架)

近年来大量研究表明核内充满了一个主要由非组蛋白纤维组成的网络状结构。这种网络状结构最初由 R. Berezney 和 O. S. Coffey 等人(1974 年)从大鼠肝细胞核中分离出来的。他们将其命名为核基质(nuclear matrix),也有被称为核骨架(nuclear skeleton)。实验表明,低等和高等真核细胞中都存在这种结构。目前对核骨架或核基质的概念有两种理解:广义的概念是,核基质由核纤层、核孔复合物和一个不溶的网络状结构(即核基质)组成;狭义的概念是,仅指在细胞核中存在的一个由纤维蛋白构成的纤维网架体系,它不包含核膜、核纤层、染色质和核仁等成分,但这些网络状结构与核纤层及核孔复合物、染色质等有结构与功能联系。

有关核基质的形态结构可见 Coffey 等(1991)的示意图(图 7－34)。由图可见,核内部由纤维蛋白形成的网络充满整个核内空间,残存核仁与染色质网络在该纤维网架中,核内部纤维网络与核纤层有丰富的纤维联络,构成了整个核骨架网络。实验表明,这些网架纤维的粗细是不一致的,直径可由 3～30 nm,单丝直径约为 3～4 nm,粗纤维可能是单纤维的复合物。

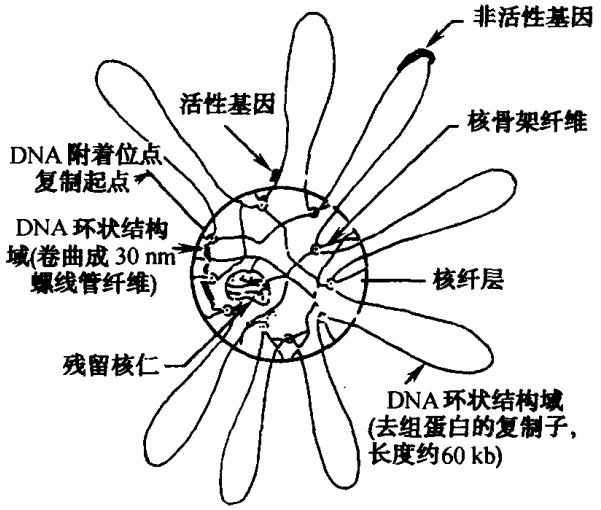


图 7－34 核基质(核骨架)结构示意图(引自 Ward, Coffey, 1991)

核基质的主要成分是纤维蛋白,并含有少量 RNA。通常认为 RNA 在核基质结构之间起着某种联结和维系作用,它对保持核基质

三维网络的完整性可能是必需的。在分离的核基质中常含有少量 DNA,但一般认为是核基质结构与 DNA 有功能的结合。组成核基质的蛋白成分是较为复杂的,它不像细胞质骨架如微管、微丝和中间纤维等是由专一的蛋白成分组成,并且在不同类型细胞中也有差异。近年来发现的有定位于核基质、呈现纤维颗粒样分布的蛋白 nuclear matrin,它们可能是核基质上 DNA 环的结合蛋白;其他还有 Nuc^{2+} 蛋白、ARBP(attachment region binding protein)、核内肌动蛋白(actin)等。Nuc^{2+} 蛋白相对分子质量为 7.6×10^4,存在于核基质中,与富含 AT 的 DNA 序列有特异的亲和性。ARBP 相对分子质量约为 9.5×10^4,能特异地与 MAR(matrix－attached region)序列结合,在组织中广泛存在,它可能在转录过程中与维持 DNA 特定的拓扑结构有关;而存在于核基质中的核内肌动蛋白可能在 mRNA 的合成过程中起重要作用。

除了组成核基质的蛋白外,还发现有不少与核基质结合的蛋白,如与 DNA、RNA 代谢合成有关的 DNA 多聚酶、RNA 多聚酶、RNP 和 DNA 拓扑异构酶Ⅱ等;与细胞信号转导有关的蛋白如蛋白激酶 C 和钙调素结合蛋白等;癌基因与抑癌基因产物如 C－Myc 蛋白、RB 蛋白等。这些核基质结合蛋白与核基质蛋白一起共同完成核基质多种生物学功能。

近年来研究表明,细胞核内许多重要生命活动与核基质的作用密切有关。如通过一系列研究,提出了核基质可能是 DNA 复制的基本位点。DNA 以袢环(loop)形式锚定(anchor)在核基质纤维上,Coffey(1980)和 Berezney(1981)分别以 3T3 成纤维细胞和小鼠再生肝细胞为材料,不仅证实了 DNA 袢环固着在核基质上,而且实验也显示了新合成的 DNA 结合在核基质上,然后逐步转移。电镜放射自显影的实验也表明了 DNA 复制的位点结合于核基质上。现认为核基质可能是 DNA 复制的空间支架,DNA 袢环的根部结合在核基质上。DNA 袢环与 DNA 复制有关的酶和因子如 DNA 多聚酶等锚定在核基质上形成 DNA 复制体(replisome)进行 DNA 复制和合成。通过研究表明,DNA 袢环结合在核基质上的核苷酸序列被称为 MAR 序列。该序列富含 AT,它通过与核基质相互作用,参与调节基因的复制与转录作用。大量研究工作也表明真核细胞中 DNA 的转录与 RNA 加工均与核基质有关。D. A. Jackson 等(1981)用 ^3H－UdR 脉冲标记 HeLa 细胞,发现＞95％以上的放射性存在于核基质上,说明 RNA 是在核基质上进行合成的。核基质是细胞中 DNA 转录的位点。进一步实验证实,具有转录活性的基因结合在核基质上,核基质上有 RNA 聚合酶的结合位点,只有与核基质结合的基因才能被转录。正如前述,DNA 袢环中存在与核基质结合的 MAR 序列,MAR 序列一般位于 DNA 袢环或活性转录基因的两端,并且该序列中存在 DNA 拓扑异构酶Ⅱ的作用位点,DNA 袢环可能通过 MAR 和 DNA 拓扑异构酶Ⅱ的结合锚定在核基质上。实验表明,MAR 之存在可增加基因表达水平。近年来也有人提出核基质可能是细胞核内 hnRNA 的加工场所。

此外,一些学者认为核基质参与了染色体构建过程,但这两者关系的许多细节问题尚有待进一步阐明。J. Pienta 等(1984)提出 DNA 袢环与核基质共同构建染色体的模型。根据这个模型表明,核基质可能对于间期核内 DNA 有规律的空间构型起着维系和支架的作用,它们参与了染色质高级包装过程。Laemmli 等(1977)在特定条件处理 HeLa 细胞中期染色体的实验中发现,染色体中存在非组蛋白骨架(染色体骨架),该染色体骨架四周是 DNA 袢环,其根部结合在染色体骨架上。但染色体骨架是否由间期核基质转变而来,即有关间期核基质与有丝分裂期染色体骨架在结构、成分和功能上的关系,尚不清楚,已有一些资料显示

出染色体骨架与核基质中存在一些相同的蛋白组分。有人认为核基质的某些结构组分可能转变为染色体骨架，也有人将核基质与染色体支架完全等同起来，因此，迄今为止，有关分裂期染色体骨架与间期核基质的关系仍是一个有待深入探讨的问题。

近些年来，核基质的研究有了很大进展，一系列工作表明核基质与 DNA 复制、RNA 转录与加工、染色体构建等密切相关，但仍有许多方面，如在核基质的结构组分和生化功能、核基质空间构型与 DNA 复制、转录装置结构及染色体构建的作用等许多问题，均有待进一步研究。

7.6 真核细胞基因表达在转录水平上的调控

正如前述，染色质（或染色体）是遗传物质的载体，而遗传信息表达（由 DNA 转录为 RNA，RNA 翻译为蛋白质）的过程是严格地按照一定的时间和空间顺序进行的，其调控表现在不同阶段和水平。一般认为转录水平上的调控是关键的，它是真核细胞基因表达调控的主要环节。实验表明，真核细胞基因表达的调控一方面受到基因调控的顺式作用元件（*cis* - acting element）影响；另一方面也受控于反式作用因子（*trans* - acting factor）的调节。在绝大多数情况下，基因表达转录调控是通过顺式作用元件与反式作用因子的相互作用而实现的。

真核细胞基因表达转录调控的顺式作用元件由启动子（promoter）和 DNA 调节序列（regulatory DNA sequences）组成。后者包含了与基因调节蛋白（即特定转录因子）结合、并作用于启动子的 DNA 序列，如增强子（enhancers）等（图 7 - 35）。

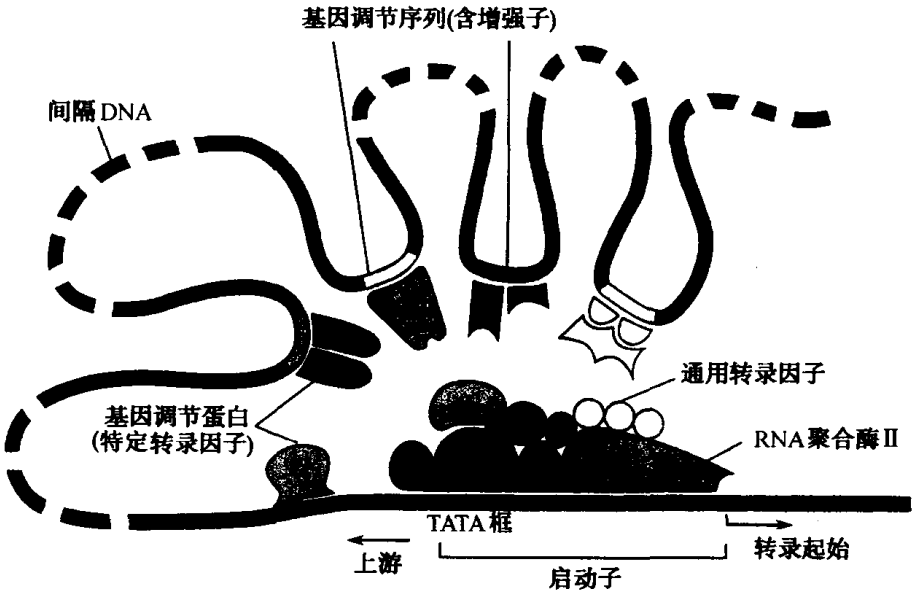


图 7 - 35 一个典型的真核基因的调节示意图

通用转录因子和 RNA 聚合酶Ⅱ组装在基因启动子序列上，绝大多数被 RNA 聚合酶Ⅱ作用的启动子具 TATA 框的结构模式，它是通用转录因子组装的位点，距离转录起始点上游约 25 bp 处。基因调节序列作为基因调节蛋白结合位点，它作用于转录起始效率。调节序列（如增强子）可定位靠近启动子，也可远离启动子，也可在基因 3′端下游出现。通用转录因子组装在启动子上，在 RNA 聚合酶Ⅱ作用下，它们对所有基因转录都是相同的，而基因调节蛋白（特定转录因子）及其结合位点对于不同基因是不同的，多种转录因子的综合作用去确定转录的起始

7.6.1 启动子与增强子——基因调控的顺式作用元件

7.6.1.1 启动子(promoter)

启动子是作用于真核细胞基因转录起始、能被 RNA 聚合酶识别并与之结合的特异性 DNA 序列,它是基因准确和有效地进行转录所必需的结构。与原核生物相比,真核生物的基因转录起始是个受控于多种信号调节的更为复杂的过程,有以下几点重要的区别:①首先区别在 RNA 聚合酶本身,原核生物如细菌 3 种 RNA 合成均由一种 RNA 聚合酶所催化,而真核细胞有 3 种 RNA 聚合酶,它们分别负责不同的 RNA 之合成。正如前述,RNA 聚合酶Ⅰ催化 rRNA 前体合成,而 mRNA 前体和一些小分子 RNA 由 RNA 聚合酶Ⅱ催化,RNA 聚合酶Ⅲ催化 tRNA、5S rRNA 及一些小分子 RNA 基因的转录;②真核生物 RNA 聚合酶起始转录时需要一系列蛋白如通用转录因子等(详见后)参与下才能进行,而原核生物如细菌 RNA 聚合酶起始转录不需要其他附加蛋白的帮助;③真核生物中启动子可被分散在 DNA 链上的许多调节序列所影响,甚至是远离启动子数千个核苷酸序列以上的增强子,也能影响转录起始,反之,在细菌中,基因转录起始的调节通常被邻近启动子的单个 DNA 调节序列所调节;④真核生物中,DNA 被组装入核小体,并进一步构建为染色质的结构,决定了在转录起始方面具有自身的特点,而细菌基因组 DNA 则不具有这些结构特点。通过对不少真核生物在 RNA 聚合酶Ⅱ作用下编码蛋白质基因启动子的分析,已发现一个高保守的 TATA 框(TATA box)的结构是编码蛋白质基因启动子的共同结构模式。在这个模式中,基因转录起始点上游围绕在 -25 附近(约从 -35 至 -20 bp)存在一个富含 AT 碱基的 $TATA^{A}_{T}$ 序列,被称为 TATA 框,它的功能类似原核生物的 pribnow 框。在通用转录因子和一些基因调节蛋白(特定转录因子)的作用下,它能保证转录准确在起始点开始。实验表明,TATA 框中单个碱基缺失或突变时,转录起始点会产生漂移,并将会剧烈降低含 TATA 框的启动子的转录作用。在一些真核生物中,在 TATA 框上方,即围绕在 -75 bp 处左右,有一个恒定的 GGTCCAATCT 序列,被称为 CAAT 框,它对维持某些种类的基因转录是必需的。在某些基因中,在转录起始点上游 -100 至 -200 bp 处包含有 GGGCGGG 序列(又称 GC 序列)、GCCACACCC 序列等。CAAT 框和 GC 序列主要作用于转录起始频率,CAAT 框中碱基的缺失也会导致转录效率的急剧降低。

与上述 RNA 聚合酶Ⅱ一样,RNA 聚合酶Ⅰ和 RNA 聚合酶Ⅲ也均能通过作用于启动子分别参与多种 RNA 基因表达转录水平的调控,但它们催化 RNA 基因转录的启动子各具结构特点,如 RNA 聚合酶Ⅰ的功能是催化合成 rRNA 前体。实验表明,在编码人的 rRNA 前体基因启动子区域含有两个顺式调控序列:一个是核心成分(core element),位于 +20 至 -45 碱基处,它是转录所必须的,包含了转录起始点;另一个是上游调控成分(upstream control element, UCE),约 50 bp 长度,它始于起始点上游约 -100 bp 处,是作为反式激活蛋白结合的靶位。与 RNA 聚合酶Ⅰ、Ⅱ不同,RNA 聚合酶Ⅲ催化的 tRNA 与 5S rRNA 等基因的启动子及其调控区不在转录起始点上游,它们均位于基因的内部。如 tRNA 基因启动子成分被命名为 A 框(A box)和 B 框(B box),它们分别编码 D 环和 TψCG 环;又如非洲爪蟾 5S rRNA 基因的启动子与调控区位于基因的内部,在起始点下游 +81 至 +99 bp 处,被命名为 C 框(C box)。通过与转录因子 TF Ⅲ A 等结合,在 RNA 聚合酶Ⅲ作用下起始转录

(详见后文)。

7.6.1.2 增强子(enhancer)

增强子是广泛存在于生物体基因中的一个调节序列。在真核细胞中,增强子是通过与特定转录因子结合,作用于启动子 DNA 序列,增强与之相连锁的基因转录活性的一种远端遗传性控制元件,它能结合特定转录因子或影响 DNA 构象,从而增强与之相连锁的基因的转录活性。增强子最早发现于 DNA 肿瘤病毒 SV40。Reddy 等观察到在 SV40 DNA 基因组中包含两个 72 bp 的串联重复序列,它们位于转录单位起始点上游处,如删除这两个序列会显著降低其体内的转录效率。进一步的研究表明不仅在病毒基因组中,在真核细胞基因组中也发现了增强子是普遍存在的,如海胆 H2A 组蛋白 DNA 远离 TATA 框的上游区存在富含 A+T 的增强子序列,如缺失这一段序列,将会使 H2A 组蛋白基因表达下降 15～20 倍。实验表明,增强子常由几个亚单位组成,这些亚单位成分均可与特定转录因子结合,相互协同,作用于基因表达之调节。一般认为增强子的作用有下列显著特征:①增强子可远离转录起始点,具有远程效应。有的增强子距离其作用的启动子可相隔 50 kb 或更多,仍具有调节效应。有人认为可能与启动子和增强子之间的 DNA 序列可形成袢环(loop),导致结合在增强子上的转录因子可协助作用于启动子效应有关(详见后文);②它可位于基因 5′端上游、基因内或基因 3′端下游序列中都能表现其增强功能;③增强子的生物效应需要特定转录因子(基因调节蛋白)的参与;④增强子的活性与其在 DNA 双螺旋结构中的空间方向性有关;⑤大多数增强子具有相对的组织和种族特异性,即在特定的细胞类型中才能发挥其调节功能,如从一些小鼠病毒得到的增强子不能活化灵长类细胞基因转录作用。有人认为,增强子的组织特异性可能是发育和分化过程中细胞基因差别表达的基础之一。但有些增强子如 SV40 增强子则几乎能在所有类型的细胞中发挥作用。近年来观察到在顺式作用元件中存在一种与增强子作用相反的序列,被称为沉默子(silencer),它参与了基因表达调节的抑制作用。有人认为可能它与相应的反式作用因子结合后阻抑了增强子及反式作用因子的激活作用有关。

7.6.2 转录因子——基因调控的反式作用因子

基因调控反式作用因子即转录因子主要有通用转录因子(general transcription factor)和与 DNA 调节序列结合的基因调节蛋白(gene regulatory protein)即特定转录因子,目前已被分离纯化或被鉴定的转录因子(transcription factor)达数百种,它们通过识别并与特定的 DNA 调节序列结合发挥对基因表达的调节作用。

7.6.2.1 通用转录因子及其在转录起始中的调节作用

前已叙及,真核生物 mRNA 转录起始是个复杂过程,需要一系列蛋白质与启动子 TATA 框结合并与 RNA 聚合酶Ⅱ组装为转录起始复合物。现将在 RNA 聚合酶Ⅱ作用下,结合在 TATA 框核苷酸序列上的蛋白质称为通用转录因子。编码这些转录因子的基因已有不少被克隆和测序,表明具有很高保守性。已被分离和鉴定的在 RNA 聚合酶Ⅱ作用下起始转录需要的人通用转录因子有 TF ⅡA, TF ⅡB, TF ⅡD, TF ⅡE, TF ⅡF, TF ⅡH 等。TF ⅡD 相对分子质量为 7.5×10^5 左右,是由一个与 TATA 框结合的蛋白质(TBP)和与 TBP 结合的含有多于 8 个亚基的因子(TAFs)所组成。TF ⅡA 相对分子质量为 1.0×10^5

左右，也由数个亚基组成。TF ⅡB 相对分子质量为 3.3×10^4，TF ⅡF、TF ⅡE 和 TF ⅡH 的相对分子质量分别为 2.1×10^5、1.8×10^5 和 2.3×10^5，它们也均由数个亚基组成。

通过研究表明，这些通用转录因子在 mRNA 起始转录复合物的组装过程中是有序进行的。实验表明，TF ⅡD 首先通过其亚基 TBP 特异地与启动子 TATA 框结合，然后 TF ⅡA 和 TF ⅡB 与其结合，继之，由 TF ⅡF 与 RNA 聚合酶Ⅱ形成的复合物与已结合了上述多种通用转录因子的启动子结合，然后是通用转录因子 TF ⅡE、TF ⅡJ、TF ⅡH 组装进入该复合物。已证实 TF ⅡH 具有蛋白激酶的活性。因此，在 ATP 的存在下，它可磷酸化 RNA 聚合酶Ⅱ，导致该酶构象改变而被释放，从而起始转录（图 7－36）。现已知 mRNA 起始转录复合物至少包含有 40 种多肽。经研究表明，通用转录因子具有较高的保守性，在生化实验中酵母的通用转录因子能取代人类细胞中相应的一些通用转录因子发挥作用。在生物体中也发现在一些情况下，当通用转录因子与 RNA 聚合酶Ⅱ自身不能有效组装时，需要结合在增强子等 DNA 调节序列上的转录因子的帮助，刺激其组装过程（图 7－37）。有人认为在增强子与启动子之间的 DNA 序列可作为系绳伸出形成环，从而允许结合在增强子上的特定转录因子去和结合在启动子上的通用转录因子和 RNA 聚合酶Ⅱ进行接触与作用，激活起始转录装置。增强子等 DNA 调节序列上结合的特定转录因子可通过几种不同方式与通用

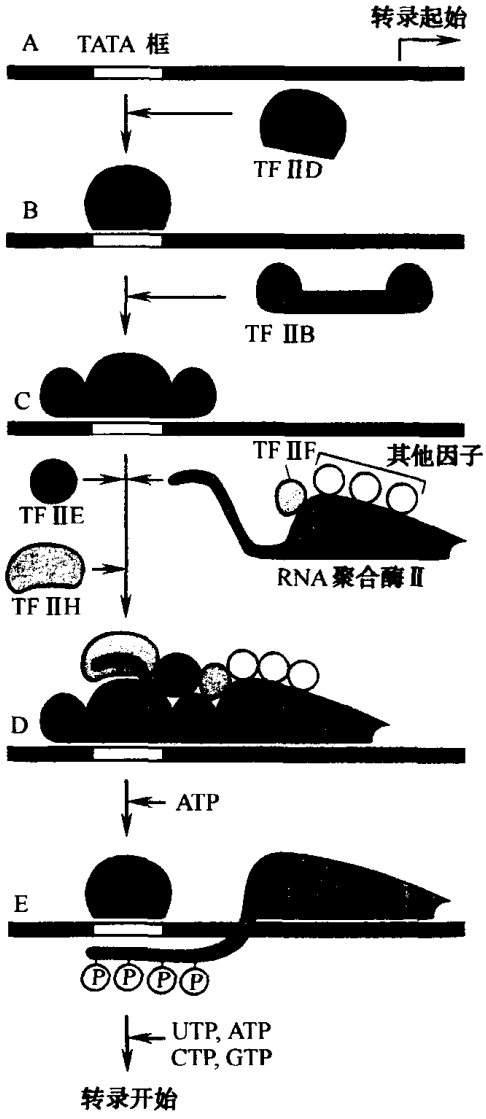


图 7－36　在含 TATA 框的启动子上通用转录因子与 RNA 聚合酶Ⅱ组装为转录起始复合物与转录起始示意图

A. 为了起始转录，RNA 聚合酶Ⅱ需要系列的通用转录因子（如 TF ⅡA、TF ⅡB 等），启动子包含有 TATA 框的序列，位于起始点上游 25 个 bp 处；B. TATA 框被 TF ⅡD 辨认并结合；C. 然后再结合 TF ⅡB，TF ⅡA 等（TF ⅡA 未标出）；D. 其他通用转录因子如 TF ⅡE，TF ⅡH与 RNA 聚合酶Ⅱ在启动子上组装成复合物；E. 然后 TF ⅡH 利用 ATP 水解能量去磷酸化 RNA 聚合酶Ⅱ改变其构象，导致该酶被释放，从而起始转录。TF：转录因子（引自 B. Alberts, 1998）

转录因子作用，如可直接与通用转录因子结合并进行作用，或可通过一个中介的共活化因子(coactivater)间接与通用转录因子结合与作用等，这可能也是增强子对启动子调节具远距离效应的一种解释。

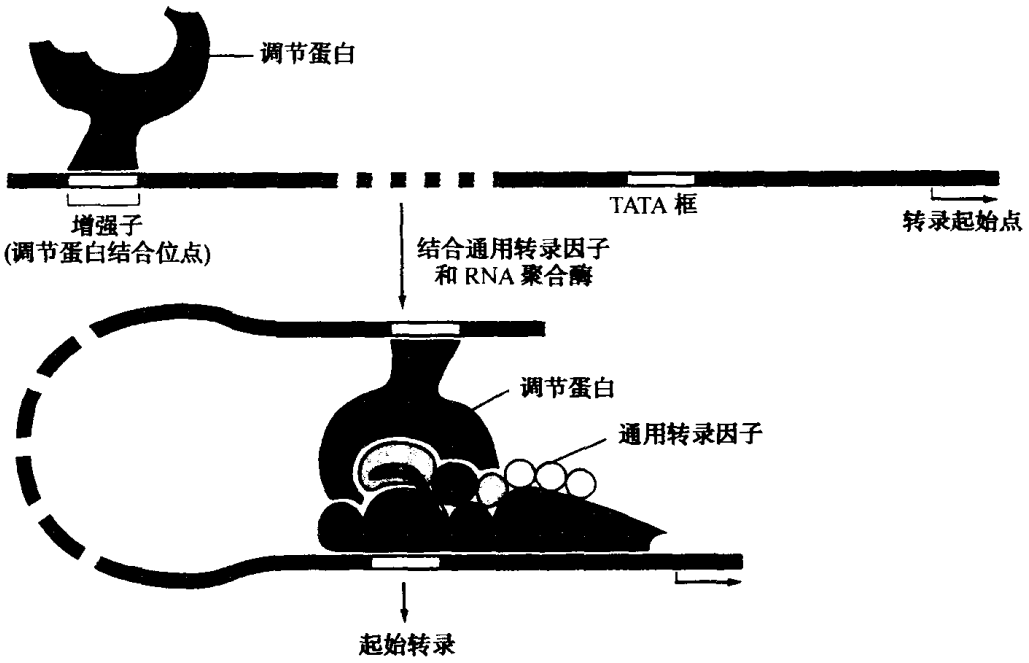


图 7－37 真核生物基因活化距离效应模型图解

在一些情况下，通用转录因子和 RNA 聚合酶Ⅱ在启动子上不能有效地自身组装为转录起始复合物，需要结合在增强子序列上的调节蛋白(特定转录因子)的帮助，刺激组装。形成的 DNA 袢环允许结合在增强子序列上的调节蛋白(特定转录因子)和结合在启动子上的转录起始复合物接触和进行刺激(引自 B. Alberts, 1998)

在 rRNA 与 tRNA 等基因转录过程中，也分别观察到 RNA 聚合酶Ⅰ和 RNA 聚合酶Ⅲ作用于转录起始，也需要一些转录因子与启动子结合。

前已叙及，人 rRNA 前体基因启动子区域有两个顺式调节元件，它们分别是核心成分和起始点上游调控成分 UCE。已知有两个转录因子分别与这些调节序列结合，一是上游结合因子(upstream binding factor, UBF)，与核心成分和上游调控成分 UCE 结合成复合物；另一个是选择因子(selectivity factor 1, SL1)，它与上述 UBF－DNA 复合物结合并起稳定该复合物的作用，SL1 是一个多聚体蛋白质，由 TBP 和 3 个 TAF1 组成。最后 RNA 聚合酶Ⅰ(Pol Ⅰ)与上述复合物结合，完成起始复合物的组装并起始转录(图 7－38)。

与 RNA 聚合酶Ⅰ、Ⅱ不同，被 RNA 聚合酶Ⅲ作用的 tRNA 和 5S rRNA 基因的启动子和调控区均位于基因的内部。正如前述，tRNA 基因启动子成分为 A 框和 B 框，有两个转录因子即 TF ⅢC 和 TF ⅢB 与上述 DNA 序列结合。TF ⅢC 由 6 个多肽组成，相对分子质量约为 6.0×10^5，TF ⅢB 由 3 个亚单位组成，一是 TBP，另一个是 BRF(TF ⅡB－related factor)，第 3 个是 B″，它是一个相对分子质量为 9.0×10^4 的多肽。在 tRNA 基因转录起始复合物的组装中，TF ⅢC 首先与启动子中 B 框和 A 框结合，然后 TF ⅢB 与 A 框上游约 50 bp 结合。当 TF ⅢB 被结合后，RNA 聚合酶Ⅲ(Pol Ⅲ)结合并起始转录(图 7－39A)。

在 5S rRNA 基因转录起始中，参与作用的转录因子除 TF ⅢC 和 TF ⅢB 外，尚有 TF

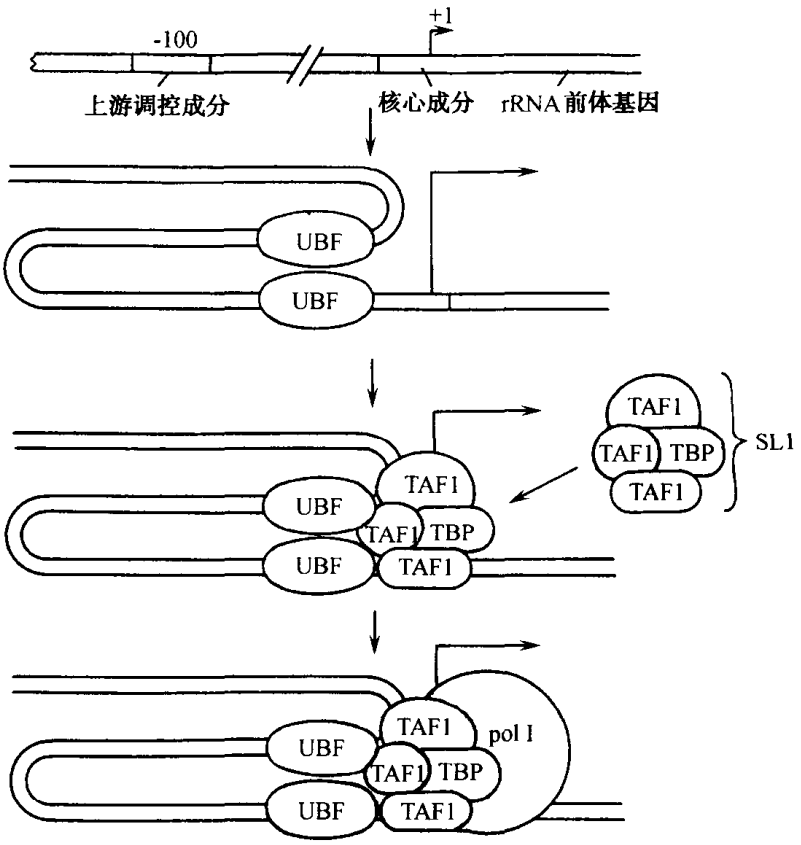


图 7－38　RNA 聚合酶Ⅰ转录起始复合物组装模型图解 rRNA 前体基因转录单位调节区包含一个核心成分叠盖起始点和一个上游调控成分(UCE)定位在转录起始点上游约 100 bp 处,UBF 与核心成分和 UCE 结合,然后选择因子 1(SL1)与 UBF－DNA 结合。最后与 RNA 聚合酶Ⅰ结合并完成起始复合物的组装(引自 Darnell, 等, 1995)

ⅢA。在转录起始复合物组装中,首先 TF ⅢA 与 C 框启动子成分相结合,然后通过蛋白质间相互作用,TF ⅢC 和 TF ⅢA 结合,当 TF ⅢB 与上述复合物结合被组装进入该复合物后,RNA 聚合酶Ⅲ结合并起始转录(图 7－39B)。

不难看出,TBP 是 3 种 RNA 聚合酶作用于基因转录过程中均需要的一种转录因子。

7.6.2.2　转录因子的 DNA 结合结构域

已知转录因子的功能是通过与特定 DNA 调节序列相互作用而实现的。因此它们必须具备识别和结合这些 DNA 调节序列的能力和能与 RNA 聚合酶或其他转录因子结合的特性。根据已有的研究资料,在转录因子中已被鉴定出具有不同的功能结构域,包括 DNA 结合结构域(DNA binding domain)和转录激活结构域(transcription activating domain),这些不同的功能结构域独立存在,分别行使功能,在调节基因转录过程中发挥作用。

目前已发现的真核生物转录因子的 DNA 结合结构域大多在 100 个氨基酸以下,具有多种结构模式(motif)与特定的 DNA 序列作用。已知有 α 螺旋－转角－α 螺旋、锌指型、亮氨酸拉链、螺旋－环－螺旋和 HMG 框(HMG box)结构模式等。

1. α 螺旋－转角－α 螺旋结构模式(helix－turn－helix motif)

该模式最早被鉴定出是在原核基因的激活蛋白和阻遏蛋白中发现的,也是最简单和普通的 DNA 结合蛋白的模式。现已在原核生物与真核生物中发现有百种以上具有这种结构模式的 DNA 结合蛋白,如 OCT－1、OCT－2 等。这种蛋白与 DNA 结合形成对称的同型二聚体结构。构成二聚体的每个单位由 20 个氨基酸组成 α 螺旋－转角－α 螺旋结构,两个 α 螺旋相互连接构成转角,其中一个 C 端的 α 螺旋为识别螺旋(recognition helix),负责识别 DNA 大沟的特异碱基信息,另一个螺旋没有碱基特异性,与 DNA 磷酸戊糖链骨架接触(图

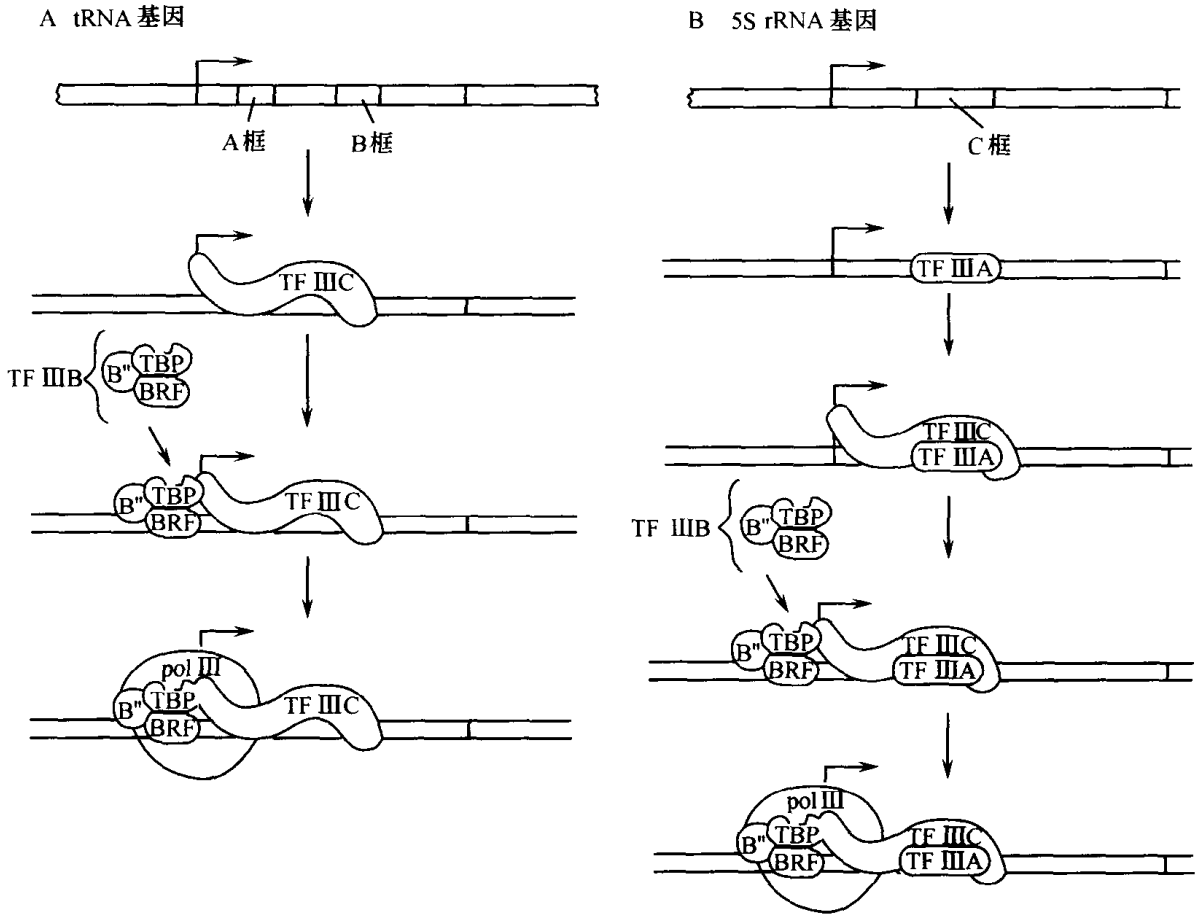


图 7－39 在酵母中 tRNA 和 5S rRNA 基因转录中，RNA 聚合酶Ⅲ转录起始复合物组装模型图解
A. tRNA 基因转录的起始。TF ⅢC 和启动子 B 框和 A 框结合，然后再结合 TF ⅢB(TBP 是 TF ⅢB 中的一个亚基)，当与 TF ⅢB 结合后，RNA 聚合酶Ⅲ与上述复合物结合并起始转录；B. 5S rRNA 基因转录的起始。首先 TF ⅢA 与启动子 C 框成分结合，通过蛋白质间的相互作用，TF ⅢC 和 TF ⅢA 结合，当 TF ⅢB 与该复合物结合后，RNA 聚合酶Ⅲ结合并起始转录(引自 J. Darnell，等，1995)

7－40A)，在与 DNA 特异结合时，以二聚体形式发挥作用，识别螺旋的氨基酸侧链与 DNA 特定碱基对间以氢键结合。

2．锌指型结构模式(zinc finger motif)

该模式的共同特点是以锌作为活性结构的一部分，同时都通过 α 螺旋结合于 DNA 双螺旋结构的大沟中(图 7－40B)。该结构模式至少可分为两类，一类是 Cys－His(C_2H_2)锌指，如转录因子 TF ⅢA 和 SP1 等属于该类；另一类是 Cys－Cys(C_4)锌指，这类构型中含有两对半胱氨酸，不含有组氨酸，如类固醇受体等。在 RNA 聚合酶Ⅲ的转录因子 TF ⅢA 中具有 9 个重复的锌指状结构，属于锌簇蛋白。每个单位大约由 30 个氨基酸残基组成，上述重复的锌指结构是以锌将一个 α 螺旋与一个反向平行 β 片层的基部以锌原子为中心，通过与 2 个半胱氨酸和 2 个组氨酸残基形成配位键连接，TF ⅢA 分子通过由 9 个锌指结构重复出现的 α 螺旋识别并与 DNA 大沟碱基结合，使得这类蛋白与 DNA 结合很牢固。另一个转录因子 SP1 是以 3 个连成串的锌指结构与 DNA 顺式元件 G－C 框结合。

3．亮氨酸拉链结构模式(leucine zipper motif)

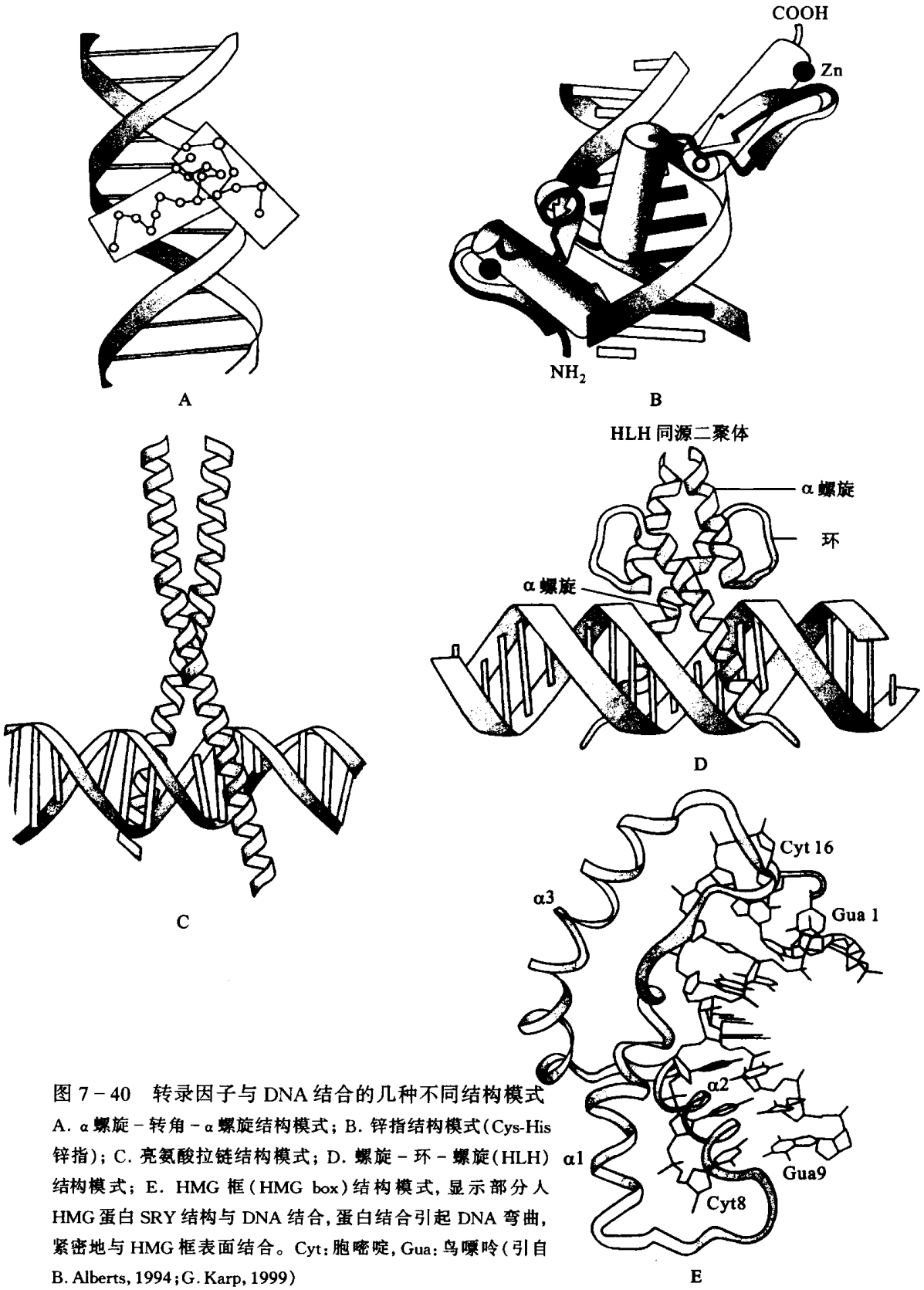


图 7－40　转录因子与 DNA 结合的几种不同结构模式

A. α 螺旋－转角－α 螺旋结构模式；B. 锌指结构模式(Cys-His 锌指)；C. 亮氨酸拉链结构模式；D. 螺旋－环－螺旋(HLH)结构模式；E. HMG 框(HMG box)结构模式，显示部分人 HMG 蛋白 SRY 结构与 DNA 结合，蛋白结合引起 DNA 弯曲，紧密地与 HMG 框表面结合。Cyt：胞嘧啶，Gua：鸟嘌呤(引自 B. Alberts, 1994；G. Karp, 1999)

具有这种结构的蛋白羧基端部分的一些氨基酸残基(富含亮氨酸序列)能形成 α 螺旋结构，其中每隔 6 个氨基酸，就有 1 个亮氨酸残基，这些亮氨酸残基都在螺旋的同一个方向出现。每个具有 α 螺旋的单体通过亮氨酸残基作用形成二聚体，形似拉链。一般认为，亮氨酸

拉链并不直接结合 DNA,而是由每个单体氨基酸富含碱性氨基酸结构域与 DNA 大沟的特定 DNA 序列结合(图 7－40C)。这类蛋白与 DNA 特定的结合都是以二聚体形式发挥作用的。具有该类结构模式的转录因子有增强子结合蛋白 C/EBP、Jun、Fos 和酵母中的 GCN4 等。

4. 螺旋－环－螺旋结构模式(helix－loop－helix motif, HLH)

在 HLH 结构模式中,包括两个两性的 α 螺旋,其中间为非螺旋的环区,两个两性螺旋在其一侧呈现一个疏水残基面,而另一侧则为荷电残基。具有这种性质的 α 螺旋参与了 HLH 蛋白二聚体的形成并与靶 DNA 序列结合(图 7－40D)。与上述亮氨酸拉链结构模式相似,HLH 蛋白也是以二聚体形式与 DNA 结合。研究表明,α 螺旋在 HLH 蛋白与 DNA 的结合过程中起重要作用,如缺少与 DNA 结合的 α 螺旋时,HLH 蛋白虽能形成异源二聚体,但是不能与 DNA 牢固结合。转录因子 Myo－D、原癌基因产物 Myc 等具有该类结构模式。

5. HMG(high mobility group)框结构模式(HMG－box motif)

HMG 框首先在一组丰度高的蛋白即高迁移率(HMG)蛋白中发现并被命名。该模式由 3 个 α 螺旋组成为一个 boomerang shaped 的结构模式与 DNA 结合(图 7－40E)。具有 HMG 框的转录因子被认为可作为一个"建筑"因子(architectural factors)通过弯曲 DNA 活化转录作用,可能与促进相邻位点其他转录因子结合的相互作用有关。如一种被称为 SRY 的 HMG 蛋白,它被 Y 染色体上的基因编码。它通过活化基因转录在人雄性性别分化中起重要作用。如 SRY 基因突变时,其编码的蛋白就不能结合 DNA,导致性别逆转,带有这种表型的许多个体具有 XY 性染色体对,但是发育为雌性。另一个 HMG 蛋白为 UBF,前已叙及,在 rRNA 基因转录中发挥作用。UBF 以二聚体形式与 DNA 结合,其两个亚基包含 10 个 HMG 框,通过与 DNA 连续位点的相互作用使 DNA 弯曲成袢环(图 7－41),使 DNA 调节序列彼此靠近,导致一个或更多的转录因子的协调合作,从而有利于进行转录。

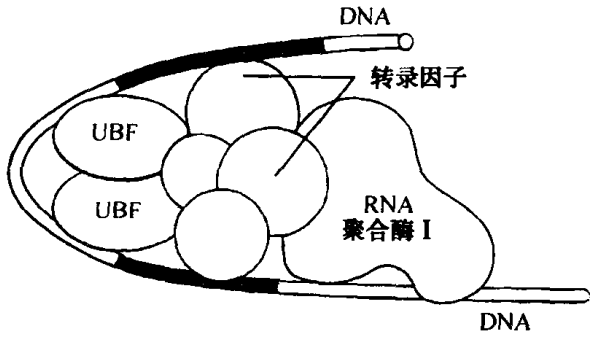


图 7－41 图示 HMG 蛋白使 DNA 弯曲成环

UBF 是一个二聚体的转录因子,通过弯曲 DNA,使 DNA 调节序列彼此靠近,导致一个或更多的转录因子协调合作,利于进行转录

7.6.2.3 转录因子转录激活结构域

真核生物中,转录因子的功能具有多样性,其转录激活结构域也有多种,它是 DNA 结合结构域以外的、通常由 30～100 个氨基酸组成。有时一个转录因子可含一个以上的活性结构域。已知活性结构域至少可分为 3 种类型:①带负电荷的 α 螺旋结构,如 AP1 家族的 Jun 和酵母中的 Gal4 等,该种活性结构域是由酸性氨基酸组成,带负电荷,能形成极性 α 螺旋。实验表明,转录因子上具有该类结构域能加速启动子上通用转录因子的组装并有稳定起始复合物的作用;②富含谷氨酰胺活性结构域,如转录因子 SP1 具有 4 个彼此分开的活性结构域,其中最强的活性结构域之一富含谷氨酰胺,可达该区总数 25%。具有该类活性

结构域的转录因子还有 AP2、OCT－1、OCT－2 和 SRF 等；③富含脯氨酸活性结构域，这类活性结构域主要存在于 CTF/NF1 转录因子的羧基端，可达 20%～30%。其他在 AP2，Jun 等转录因子中也存在这类活性结构域。活性结构域可能是转录因子与其他蛋白质接触与作用的区域，如上述 RNA 聚合酶作用于转录起始时需要多种转录因子参与，可能各种转录因子的活性结构域在相互间结合与作用及与 RNA 聚合酶的亚基作用中发挥了重要作用。表 7－2 综合了一些哺乳类转录因子与 DNA 结合位点和模式及转录激活结构域等主要特性。

表 7－2 一些哺乳类转录因子与 DNA 结合位点及其主要特性

转录因子	与 DNA 结合位点	主 要 特 性
SP1	GGGCGG	具 Cys_2－His_2 锌指型结构模式，富含谷氨酰胺激活结构域，与许多管家基因启动子结合，是广泛性活化因子
CREB	AGACGTCA	具亮氨酸拉链结构模式，被 cAMP－蛋白激酶 A 及其他多种激酶激活，参与生长转化等多功能调节
C－Jun(AP1)	TGACTCA	具亮氨酸拉链结构模式，富含脯氨酸和富含谷氨酰胺的结构域，原癌基因产物，其同源二聚体或与另一个原癌基因产物 C－Fos 结合的异源二聚体为 AP1，参与生长等多功能调节
AP2	CCCCAGGC	富含谷氨酰胺和脯氨酸结构域，提供 TPA 和 cAMP 诱导位点，被 PKC 等激酶激活
SRF	GATGCCAATA	富含谷氨酰胺结构域和脯氨酸结构域，结合血清反应元件，对血清、EGF 等生长因子反应
OCT－2	ATTTGCAT	具螺旋－转角－螺旋结构模式，富含谷氨酰胺结构域和富含脯氨酸结构域，是淋巴细胞特异活化因子

7.6.2.4 基因阻抑蛋白在基因转录中的调节作用

生物体内存在的众多转录因子并不全是活化基因转录，有一些是阻抑基因转录的基因阻抑蛋白(gene repressor protein，或称基因阻遏蛋白)。阻抑蛋白具有两个功能区，一个是与 DNA 序列结合区，一个是阻抑活化区。通过研究表明，不同的阻抑蛋白作用在不同途径：如基因阻抑蛋白与活化基因转录的转录因子竞争结合基因 DNA 调节序列；又如阻抑蛋白可与活化基因表达的转录因子活化区形成复合物，掩蔽了活化基因表达的转录因子的表面，从而影响了转录因子作用于基因的转录过程；此外，基因阻抑蛋白也可直接与通用转录因子作用，抑制起始复合物进一步组装等。通过实验表明在反式作用元件和顺式作用元件相互作用的过程中，一般是一种转录因子与一个特定的 DNA 调节序列结合，但也存在一个转录因子可与几个不同序列的 DNA 结合位点结合；反之，一个顺式作用元件也可作为多种反式作用因子的作用靶位点，即一种特定的核苷酸序列可结合多种转录因子。上述这些特点均体现出在真核生物基因表达调控中存在的精确性与灵活性，在细胞生长、分化、发育等过程中均具有重要意义。

应该指出的是，在基因转录的调节中，顺式作用元件如启动子、增强子等与反式作用元件(含活化的转录因子和基因阻抑蛋白)的调节作用涉及多种蛋白质与 DNA 及蛋白质与蛋白质之间的作用。这些调节因素共同参与基因表达调节是相互协同进行的复杂过程。一个基因表达的激活或阻抑应是上述多种因素相互协调、综合影响的结果，如人 β 珠蛋白的基因

表达调节是与众多的调节因子综合调节密切相关的(见第 9 章细胞分化)。

7.6.3 转录因子被激活的途经

外界信号作用于细胞,通过跨膜信号传递,经过系列反应,最终影响细胞内基因表达。该过程包含了刺激相关转录因子活性的重要环节,因为在不少情况下,细胞中的转录因子是处于钝化状态的。现已知转录因子通过多种方式被激活:有的转录因子可通过去除抑制蛋白或通过磷酸化和去磷酸化作用而被激活;有的与某种结合蛋白解离后而被活化,如具转录因子活性的糖皮质激素受体(GR)在细胞质中与热休克蛋白 HSP 90 结合呈非活性状态,当受激素诱导后,结合解离,形成的激素 - 受体复合物进入细胞核与糖皮质激素调节成分(glucocorticoid regulatory element, GRE)结合,激活启动子调节基因表达;有的经物理或化学因素的诱导后才具有活性,如一种热激活转录因子,它能结合在酵母热休克蛋白基因上游的调控序列上,经热诱导发生磷酸化作用后,才能激活基因表达;又如 B 细胞中 K 轻链的增强因子 NFκB 在细胞质中与抑制因子 I κB 结合,呈无活性状态,通过对抑制因子 I κB 的磷酸化作用,使抑制因子释放,NFκB 被激活进入核内。此外,有的转录因子则可与带有转录激活结构域的蛋白质形成复合物而被激活等。图 7 - 42 概括了真核生物中转录因子被激活的多种途经。

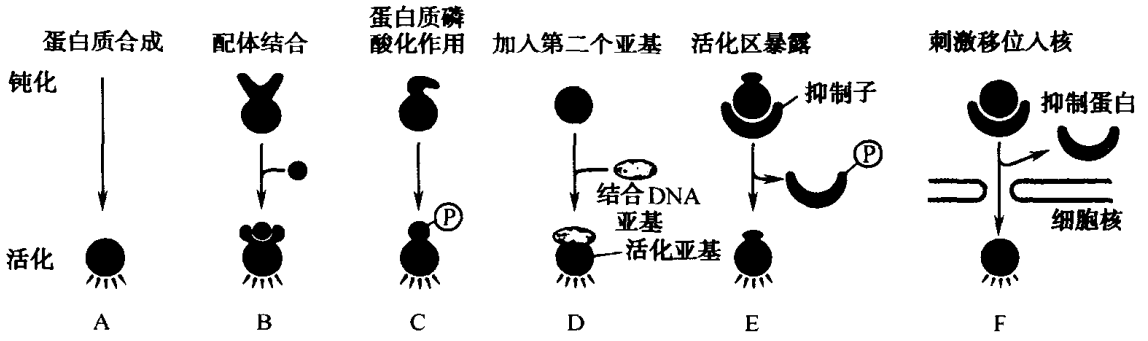


图 7 - 42 真核细胞中转录因子被激活的途经

A. 蛋白质合成后就具有活性,但很快被降解; B. 结合配体后被活化; C. 通过磷酸化被激活; D. 结合亚基的加入与带有转录激活结构域的蛋白质形成复合物; E. 通过抑制子被磷酸化后暴露活化区; F. 去除抑制蛋白,刺激转录因子进入核内

7.6.4 染色质结构与基因转录水平的调控

染色质结构与基因的转录活性有密切关系,基因的激活与转录过程只能在已被解凝集即被称为活性染色质这一特定的结构形式中进行。在间期核中,伸展和疏松的常染色质部分是转录的部位,而处于高度折叠和凝集状态的异染色质中的基因表达是不活跃的。如在 NIH3T3 细胞中,诱导 *C - fos* 基因表达时,在诱导转录的几十分钟内正在转录的基因绝大部分都分布在活性染色质中。真核生物可通过异染色质化关闭某些基因的表达。通过对人珠蛋白基因转录过程的研究表明真核细胞转录过程可能有两个步骤:第一步是局部染色质解凝集成疏松的"活化"形式;第二步是基因转录因子与 DNA 顺式元件依次结合与组装,作用于基因表达。但有关基因转录因子如何作用于包装在核小体上的 DNA 调节序列,看法并不一致,有待进一步探讨。早期观点认为 RNA 聚合酶只能在染色质结构被破坏、核小体

解聚和 DNA 完全被暴露的条件下进行转录。但近年来通过对染色质结构研究的逐步深入，有愈益增多的实验表明 RNA 聚合酶Ⅱ合成 mRNA 前体时并不是在完全裸露的 DNA 模板上进行的，即 RNA 聚合酶能通过核小体进行转录。看来在一些情况下 DNA 调节序列是被包装进入核小体，而一些基因活化转录因子仍然能进行识别并与之结合。近年来发现，在多种来源的细胞中具有一些大分子多亚基的复合物如 SWI/SNF 等，它们可利用 ATP 水解释放的能量去破坏组蛋白－DNA 的相互作用，从而允许转录因子和基因的调节序列结合。可能当转录因子与 DNA 结合后，进一步引起染色质结构变化，引起核小体处于不稳定状态，同时 RNA 聚合酶Ⅱ的结合也能使核小体去稳定，破坏组蛋白－DNA 的相互作用，它们可能使核小体核心颗粒组蛋白移位或去组装，从而导致通用转录因子与启动子作用进行组装，进一步完成转录过程(图 7－43)。也有人具体指出组蛋白 H3－H4 四聚体一旦组装到核小体中就非常稳定，而 H2A－H2B 与它的结合却很容易破坏，因此 RNA 聚合酶Ⅱ能有效转录核小体 DNA 模板序列是在 H3－H4 组蛋白四聚体存在的情况下，所形成的开放与伸展状态的核小体结构状态进行的。

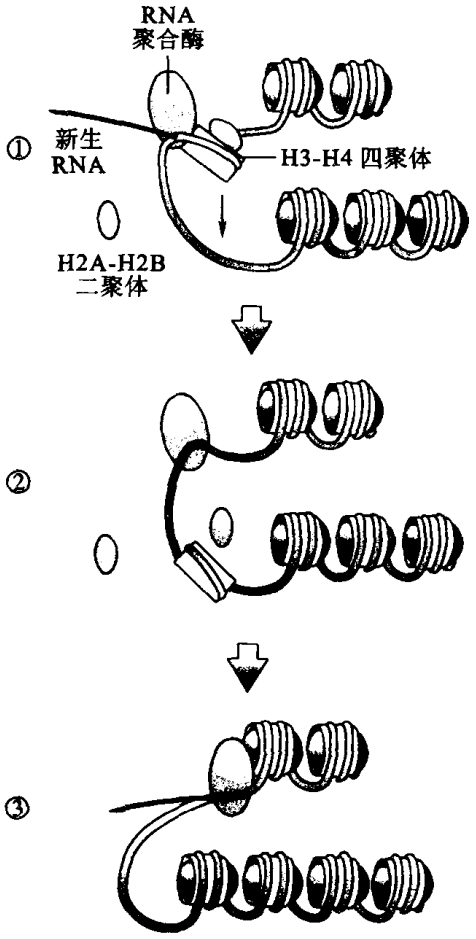


图 7－43　通过核小体核心颗粒进行转录作用的模型图解
①RNA 聚合酶使核小体去稳定，形成一个 RNA 聚合酶与核小体核心颗粒(其中 2 个 H2A－H2B 二聚体已移位)的复合物；②组蛋白核心的另一半(H3－H4 组蛋白四聚体)移位并形成了跟随 RNA 聚合酶后“自由状态”的 DNA；③H2A－H2B 等二聚体重新与 DNA 结合形成完整的核小体核心颗粒(引自 G. Karp, 1999)

近年来，通过实验表明组蛋白的乙酰化作用在上述转录过程中发挥重要作用。例如，发现在转录作用中，不少共活化因子具有乙酰转移酶的作用，如共活化因子 CBP 具有使组蛋白乙酰化的活性，当 GR(糖皮质激素受体)与 DNA 调节序列 GRE 结合时，同时共活化因子 CBP 与 GR 结合，它们相互作用，CBP 能使位于启动子区域的核小体核心颗粒组蛋白乙酰化，乙酰化的组蛋白与 DNA 分离，从而启动了转录机构中启动子的作用，在 RNA 聚合酶的

作用下，允许转录起始；反之，去除组蛋白乙酰化作用则伴随而来的是转录作用的被阻抑。

通过研究表明，与转录上不活跃的染色质相比，活性染色质上存在对 DNase I 超敏感位点(hypersensitive sites)，这个位点首先被 DNase I 消化。实验表明，这种 DNase I 超敏感位点可能是转录因子结合的部位，是重要的转录调控区。通过转基因小鼠实验也进一步证实了在红细胞发育过程中 DNase I 高敏感位点是正常 β 珠蛋白基因表达所需的一个重要调控区域。已有资料表明，与导入人 β 珠蛋白基因和邻近不含有 DNase I 高敏感位点片段相比，当导入 β 珠蛋白基因和邻近 5'及 3'高敏感位点片段时，转基因小鼠中人 β 珠蛋白表达水平出现升高现象。

此外，染色体上基因的活化与 DNA 的甲基化状态密切有关。已有资料表明，珠蛋白等基因进行转录时，在活化基因的启动子 DNA 序列上降低或缺少甲基化作用，但如该位点被甲基化，则基因处于非活化状态。通过药物实验，如 5－氮胞苷之加入，通过降低 DNA 甲基化水平，能导致钝化的基因重新被活化。关于 DNA 甲基化的缺失或降低导致基因活化的机理，已提出了一些解释与假说，如可能与影响染色质的结构和增加了 DNase I 的敏感性有关，或可能与影响启动子 DNA 与蛋白质的识别及作用有关等等，均有待进一步深入探讨。

内 容 提 要

细胞核是细胞中最大的细胞器，是细胞内基因复制和 RNA 转录场所，是细胞生命活动的调控中心。

细胞核由核被膜、染色质、核仁及呈网络状的核基质组成。核被膜是真核细胞特有的结构，由内、外两层单位膜组成。在核被膜上存在核孔复合物的结构。有多种模型描述核孔复合物的精细结构。近年来推出的核孔复合物新的结构模型中，综合起来，核孔复合物由环、辐、栓等结构亚单位组成。主要有：①胞质环(又称外环)；②核质环(又称内环)；③辐；④中心栓。

核孔复合物构成了核质间双向选择性交换的亲水通道，通过被动扩散和主动运输完成核物质的输入与输出。大分子通过核孔复合物的主动运输，是一个信号识别与载体介导且需能量、具双向性和选择性的过程。核纤层是位于细胞核内膜与染色质之间的纤维蛋白片层或纤维网络，由核纤层蛋白构成。它为核膜及染色质提供了结构支架，与核被膜的崩解和重组密切相关。

染色质、染色体是遗传信息的载体。染色质存在于细胞的间期核内，在分裂期由染色质纤维包装形成染色体。每个物种的细胞内都有一定数目的染色体，单倍染色体及其上的全部基因称为染色体组或基因组。

真核生物染色质的主要成分是 DNA、组蛋白、非组蛋白及少量的 RNA。真核生物的染色质 DNA 含量远大于原核生物。按人类基因组图谱分析，人类基因组由 32 亿 bp 组成，其中编码蛋白基因约 3～4 万(仅为线虫、果蝇的 2 倍)，含有大量的 DNA 重复序列。分析基因组中编码蛋白基因和非编码 RNA 基因，前者外显子大小具保守性，在各物种间接近一致，但在人类短的外显子有不平常的碱基组成——富含嘌呤；内含子大小、分布在人类与其他动物有本质区别。人类内含子大于其他动物，且大小变化很大，导致基因大小的变化。人类比其他动物的编码蛋白基因有高级的高水平的选择拼接，致使一个基因可产生多种蛋白。

DNA 重复序列可分为 5 大类:①转座子来源的重复序列——LINEs、SINEsLTR - 反转座子和 DNA 转座子;②细胞基因无活性的部分——常指假基因;③简单序列重复;④节段复制;⑤串联重复序列区段。此外,在人类基因组序列中发现了单核苷酸多态性(SNPs),已建立了人类基因组 SNP 图谱,对人类医学和群体遗传学有极大的全面推动作用。DNA 分子的二级结构具有多种构象,其中 B - DNA 双螺旋二级结构较稳定。在活细胞中多以此构象存在。在一定条件下 DNA 构象可发生改变,如 B - DNA 变构为 A - DNA、Z - DNA。在这几种构象的 DNA 结构中,大沟和小沟的特征对遗传信息的表达至关重要,它是调控蛋白识别遗传信息的位点。

染色质组蛋白是真核染色质的主要结构蛋白,它在基因表达调控中也起重要作用。组蛋白分为 H1、H2A、H2B、H3 和 H4 5 种,存在于所有真核细胞。H2A、H2B、H3 和 H4 有相互作用形成聚合体的趋势,这 4 种组蛋白没有种属和组织特异性,在进化上相当保守。H1 组蛋白有一定的种属和组织特异性,在构成核小体时起连接作用。除组蛋白外,所有与真核染色质结合的蛋白统称为非组蛋白。染色体骨架蛋白为非组蛋白。间期核中的非组蛋白是指那些与染色质特异 DNA 序列相结合的蛋白质,已发现众多的特异 DNA 序列结合蛋白,分为不同的结合蛋白家族,各以不同的模式与特异 DNA 序列结合。这些结合蛋白识别特异 DNA 序列的信息来自 DNA 的核苷酸序列,识别位点一般是在 DNA 双螺旋大沟部位,识别和结合是通过氢键和离子键。这些蛋白具有多方面的重要功能。

染色质结构的基本单位是核小体。每个核小体包括 4 种组蛋白八聚体和约 200 bp 的 DNA 缠绕核心组蛋白约 2 圈及一个 H1 组蛋白分子。核小体核心颗粒是盘形的核心组蛋白 8 个分子组成 4 个异二聚体:2 个 H3 - H4 二聚体在核心颗粒中心结合成四聚体,2 个 H2A - H2B 二聚体位于四聚体的两侧。核小体在 DNA 上的定位主要是由 DNA 双螺旋本身具有的可弯曲性决定的,也与在 DNA 上存在有和其紧密结合的蛋白质阻碍核小体的形成有关。在 DNA 上一些缺乏核小体的区域,能被痕量 DNase I 消化,是 DNase Ⅰ 超敏感位点,常位于基因调控区,为活性染色质的特点。

在生活细胞内,染色质一般很少呈核小体链结构,而是大部分由核小体链包装成为 30 nm 染色质纤维。核小体链如何包装成 30 nm 纤维,螺线管模型已为学者们所认可。即在组蛋白 H1 存在时,由核小体链螺旋盘绕,形成每圈 6 个(或 6～8 个)核小体,外径为 30 nm 的螺线管。一般染色质转录 RNA 的区域呈约 10 nm 纤维,转录停止区域包装成 30 nm 纤维。根据基因是否处于表达状态,分为活性染色质和无活性染色质,各有其特征;根据染色质形态结构和功能不同,分为常染色质和异染色质,异染色质又分为结构异染色质和兼性异染色质。

30 nm 染色质纤维在分裂期如何包装成染色体,曾提出了不少染色体结构模型。如多级螺旋模型及骨架和辐射环模型,其中螺旋结构和辐射环结构是染色体的基本结构,它们分别或共同存在于许多真核生物染色体。已有实验证明,染色体的超微结构具有多样性,其结构模型也具多样性。

在不同物种的细胞内都有一定数目、一定形态类型的染色体。性细胞有一个染色体组为单倍体(n),体细胞染色体为 2 倍体($2n$),有 $3n$ 以上的称为多倍体。中期染色体包装紧密,具有较为稳定的形态特征。根据着丝粒在染色体上的位置可将染色体分为 4 种类型(m、sm、st、t),而着丝粒的位置是由臂比或着丝粒指数确定的。将分裂相中期染色体,按其

着丝粒的位置和各对染色体的相对长度分组排列所构成的图像称为核型或染色体组型，如用荧光染料或其他方法可显示出染色体的带型(如Q带、G带、R带、C带等)。核型和染色体带型具有种属特异性。前者对染色体常不易精确地识别和区分，而带型能识别染色体组中每条染色体，具有更高准确性。标准的带型与核型是物种进化上稳定的特征。

染色体在细胞世代中能稳定地从这一世代传到下一代，起码需要具备3种基本结构——染色体DNA的关键序列：一个DNA复制起点、一个着丝粒及两个端粒。采用分子克隆技术将染色体的这3种DNA关键序列分别克隆出来，再加以拼接，导入酵母细胞，构成人工染色体。

此外，在某些生物细胞内或发育的一定阶段还存在有多线染色体或灯刷染色体等巨型染色体。

核仁是真核细胞间期核中最明显的结构。核仁的超微结构有3个特征性区域。通常认为纤维中心(FC)区域是rDNA储存位点；致密纤维组分(DFC)区域(也有人认为是FC与DFC的交界处)是rDNA进行转录的位点；颗粒组分(GC)区域是核蛋白体亚单位成熟和储存位点；而rRNA前体的加工在DFC区域中进行，某些加工程序也发生在GC区域中。在细胞周期中，核仁是一个高度动态的结构。核仁的再次出现与核仁染色体上的核仁组织区密切相关。核仁是rRNA合成、加工和核蛋白体亚单位装配等过程的重要场所。狭义核基质的概念是指在细胞核中存在一个由纤维蛋白构成的纤维网架体系，它与核纤层、核孔复合物、染色质等有结构与功能联系，其主要成分是纤维蛋白，并含有少量RNA。核基质可能是DNA复制和转录的位点，并参与了染色体的构建与包装过程等。

转录水平上的调控是真核细胞基因表达调控的主要环节。真核细胞基因表达调控一方面受控于基因表达调控的顺式作用元件，另一方面也受控于反式作用因子。顺式作用元件由启动子和DNA调节序列组成，后者包含了增强子。启动子是作用于真核细胞转录起始、能被RNA聚合酶识别并与之结合的特异性DNA序列；增强子是通过与特定转录因子结合、作用于启动子的DNA调节序列，它可增强与之相连锁的基因转录活性；沉默子是顺式作用元件中的另一类与增强子作用相反的DNA序列，它参与了基因表达调节的阻抑作用。基因表达调控反式作用因子即转录因子主要有通用转录因子和特定转录因子。转录因子通过不同的功能结构域如DNA结合结构域和转录激活结构域发挥其在基因转录过程中的作用。已知的DNA结合结构域有α螺旋－转角－α螺旋、锌指型、亮氨酸拉链、螺旋－环－螺旋、HMG框等结构模式；转录激活结构域有带负电荷的α螺旋结构、富含谷氨酰胺活性结构域和富含脯氨酸结构域等。转录激活结构域是转录因子与其他蛋白质接触与作用区域。生物体内也存在阻抑基因转录的基因阻抑蛋白。不同的阻抑蛋白作用在不同途径。通常一种转录因子与一个特定的DNA调节序列结合，但也存在一个转录因子与几个不同序列的DNA结合位点结合；反之，一种特定的核苷酸序列可结合多种转录因子。一个基因表达的激活或阻抑是多种因素相互协调、综合影响的结果。细胞中转录因子可通过多种途径被激活。基因转录水平的调控与染色质结构密切有关。基因转录只能在活性染色质中进行。RNA聚合酶Ⅱ可能穿越核小体进行DNA转录作用，具转录活性的染色质上存在对DNase Ⅰ超敏感位点，它可能是重要的转录调控区。染色体上基因活化与DNA甲基化状态有关，活化基因启动子DNA序列上降低或缺少甲基化作用。

思 考 题

1. 试述核孔复合物的结构与功能。
2. 真核细胞染色质 DNA 与原核的比较，其最主要的特点是什么？真核染色质 DNA 序列主要分为哪几类？各有何特点及功能？DNA 分子双螺旋二级结构具有多种构象，其中哪一种在活细胞中存在较多、构象较稳定？在其结构中哪一部分是调控蛋白识别遗传信息的位点？如何识别？
3. 组成染色质的组蛋白和非组蛋白各有何主要特性及功能？组蛋白分哪几种？哪几种有形成聚合体的趋势，如何形成？哪一种在进化上最保守，如何证明？非组蛋白在间期核中是指那些与染色质特异 DNA 序列相结合的蛋白质，可分为不同的结合蛋白家族，试列出几种结合蛋白与特异 DNA 序列结构的模式。
4. 试简述核小体的结构及其实验证据。核心颗粒与核小体有何关系与区别？核小体在染色质上的定位主要是由什么因素决定和影响？核小体的形成及其在染色质上的精确定位有何意义？
5. 由 10 nm 的核小体链如何形成 30 nm 的染色质纤维，哪一种模型已为学者们所认可，扼述其内容。30 nm 染色质纤维的直径不完全一致，为什么？H1 组蛋白在核小体上的位置已被确定，但在 30 nm 纤维中的位置尚不完全清楚，有人认为在中空螺旋管内部，你对此有何看法和设想？
6. 在间期核内如何区分有活性的染色质与无活性的染色质、常染色质和异染色质、结构异染色质和兼性异染色质？
7. 由间期核内的 30 nm 染色质纤维如何包装成染色体已提出不少模型，其中多级螺旋模型与骨架和辐射环模型的基本内容是什么？你对这两个模型有何看法？如何分析？
8. 何谓染色体组或基因组、单倍体、二倍体、多倍体、同源染色体以及姊妹染色单体？每条中期染色体主要包括哪些结构？着丝粒和端粒有何特点？各有何重要功能？什么是核型和染色体带型？研究核型和染色体带型有何意义？
9. 染色体在细胞世代中能稳定地从这一细胞世代到下一世代起码需要具备哪几种基本结构——DNA 的关键序列？各有何重要作用，有何实验证据？如何构建人工染色体，它有何用处？
10. 多线染色体和灯刷染色体典型地各存在于何种动物哪种细胞？在结构与功能上各有何主要特征？研究它们有何意义？
11. 试述核仁的超微结构及其特征，为何说核蛋白体的生物发生是核仁的功能？
12. 分别叙述基因调控的顺式作用元件与反式作用因子的组成、特性及在基因表达调控中的作用。
13. 为何说一个基因表达的激活或阻抑是多种调节因素相互协调、综合影响的结果？
14. 试述染色质结构与基因转录活性调控的相关性。

参 考 资 料

1. 汪堃仁，薛绍白，柳惠图主编. 细胞生物学. 第 2 版. 北京：北京师范大学出版社，1998. 300～373
2. 翟中和，王喜忠，丁明孝主编. 细胞生物学. 北京：高等教育出版社，2000. 247～301
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, *et al*. Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. New York & London: Garland Publishing Inc, 1994. 335～399, 401～474, 561～566
4. Alberts B, Bray D, Johnson A, *et al*. Essential Cell Biology. New York & London: Garland Publishing Inc, 1998. 245～260
5. Karp G. Cell and Molecular Biology. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, Inc, 1999. 514～574
6. Lodish H, Baltimore D, Berk A, *et al*. Molecular Cell Biology. 3rd ed. New York: Scientific American Books,

1995.307～364,405～542

7. Lamond A I, Earnshaw W C. Structure and function in the nucleus. Science, 1998, 280(24):547～553
8. Nigg E A. Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. Nature, 1997, 386(24):779～787
9. International Human Genome Sequencing Consortiam. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, the human genome, 2001(409):860～921
10. The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature, the human genome, 2001(409):928～933
11. Bickmore W A, Craig J, *et al*. Chromosome bands: patterns in the genome. New York: Springer; Austin, Texas: R. G. Landes Company, 1997
12. Edmondson D G E, Roth S Y. Chromatin and transcription. FASEB J, 1996, 10:1173～1182
13. Ptashne M, Control of gene transcription: an outline. Nature Med, 1997, 3:1069～1072

第8章

细胞增殖及其调控

细胞依靠增殖维持其存在，繁衍后代。细胞增殖是生命活动的重要特征，它包含3个组成部分，即生长、DNA复制和细胞分裂，这些均体现在细胞周期进程中。因此，细胞增殖是通过细胞周期实现的。

8.1 细胞周期概述

细胞周期(cell cycle)是指连续分裂的细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成所经历的整个过程。在这过程中，细胞遗传物质(DNA)复制，各种组分也加倍，平均分配至两个子细胞中。由于早期科学发展之局限，人们将开始在光学显微镜下观察到的形态变化明显的细胞有丝分裂现象误认为是细胞增殖的主要活动期，因此将细胞分为分裂期和静止期(即间期)；后来，随科学技术的发展，在20世纪50年代初，通过^{32}P标记蚕豆根尖细胞及其放射自显影的研究，揭示了遗传物质DNA的复制发生在静止期中的一段时间，这一段时间与有丝分裂的前后存在两个间隙(gap)，从而明确提出细胞周期概念，并且进一步证实了在动、植物体中细胞周期存在的普遍性，为细胞增殖研究的发展奠定了重要基础、开创了新方向。因此，细胞周期的揭示是20世纪50年代细胞生物学研究的重大发现之一。细胞周期被划分为4个时期：S期(DNA合成期)、M期(有丝分裂期)、G_1期(M期结束至S期间的间隙)、G_2期(S期结束至M期间的间隙)。在正常情况下，细胞沿着$G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$运转，细胞通过M期被分裂为两个子细胞，完成增殖过程(图8-1)。不同生物细胞及在同一生物个体中的不同细胞的细胞周期时间长短均表现出差异，一般说，$S + G_2 + M$的时间变化较小，而G_1期的时间变化较大，有的细胞可能缺少G_1期如胚胎细胞，有的特定细胞系缺少G_1期和G_2期如V79-8细胞。测定细胞周期(T_C)及各时相(t_{G_2}, t_S, t_M, t_{G_1})时间的方法，最经典的有标记有丝分裂百分数法(PCM法)和连续标记法等。

从增殖的角度，细胞可分为3类，即连续分裂细胞、休眠细胞和终端分化细胞。连续分裂细胞也被称为周期性细胞，因为这些细胞在细胞周期中连续运转，如小肠绒毛上皮隐窝细胞、表皮基底层细胞、部分骨髓造血细胞等；休眠细胞也被称为G_0期细胞，这些细胞暂时脱离细胞周期，不进行增殖，但在适当刺激下可重新进入细胞周期，如某些免疫淋巴细胞、肝细

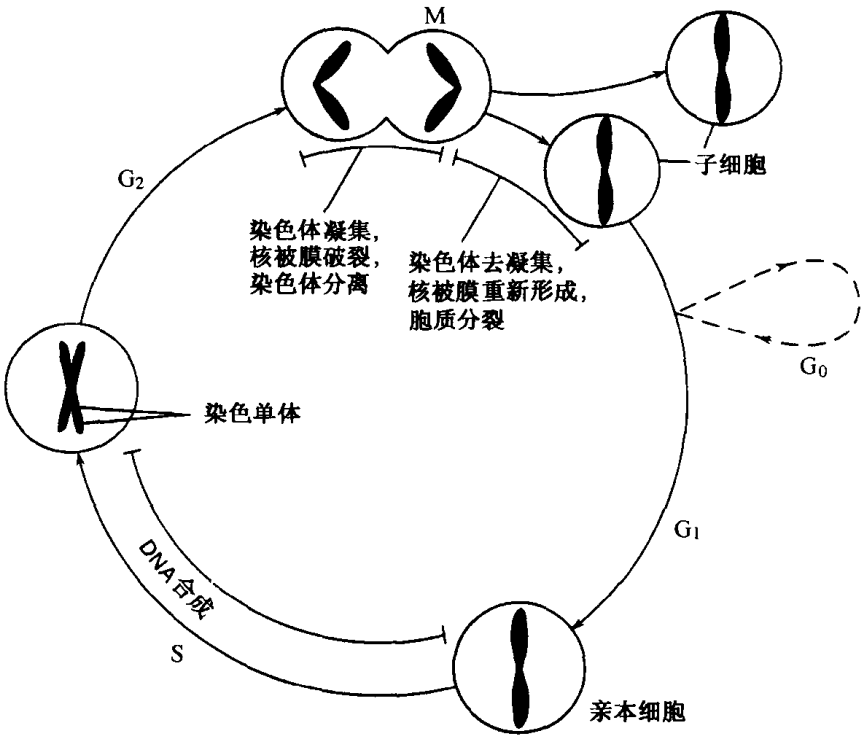


图 8-1 真核生物细胞周期图解(引自 H. Lodish)

胞等;终端分化细胞也被称为不分裂细胞,是指不可逆地脱离细胞周期、丧失增殖能力并具一定生理机能的细胞,如神经、肌肉细胞等;随生理条件之变化,细胞增殖的行为也会发生改变,如胚胎发育早期(卵裂期)所有细胞均为周期性细胞,随着发育成熟,某些细胞进入 G_0 期,某些细胞分化后丧失增殖能力,至成体时,仅少数细胞处于增殖状态,它们作为体内一些细胞死亡、丢失的补充,如造血系统中红、白细胞的死亡、丢失及表皮细胞的不断死亡、脱落等。而癌细胞则是一类增殖失控的细胞。因此,不难看出,细胞增殖及其调控与胚胎发育、细胞分化、组织更新与再生、免疫反应及细胞癌变等重大生理与病理活动密切相关。细胞周期与增殖领域的研究不仅具有重要的理论意义而且对临床疾病治疗如肿瘤征服等具有重要的实践意义。

8.2 细胞同步化

在体外培养的随机细胞群体中存在各个不同周期时相的细胞,这些处于细胞周期不同阶段的细胞,其形态学和生化特点均有所不同,并且对外界刺激如药物、辐射、细菌感染等的敏感性也不同。因此为了阐明生命活动基本规律及其对外界刺激的反应和作用机理,探讨不同周期时相细胞的生命活动规律及其对外界刺激的反应与调控机理就成为细胞生物学研究的重要内容之一,与此相关的细胞同步化方法之探索与研究也就得到了很大的关注与发展。细胞同步化(synchronization of cells)是指在生理过程中自然发生的或经人为处理造成的使细胞共同进入细胞周期同一时期的方法,前者被称为自然同步化,后者被称为人工同步化。

8.2.1 自然同步化

细胞自然同步化现象存在于动、植物及粘菌中。如粘菌(*Physarum polycephalum*)的变形体,只进行核分裂但并不同时伴有细胞质的分裂,故形成多核体。多核处于同一细胞质环境中进行同步化分裂。又如海胆受精卵可以同时受精,而受精卵最初的 3 次分裂是同步的。此外,细菌等的休眠孢子移入营养环境中,它们可一起发芽,进行同步分裂。上述的自然同步化现象被人们运用于多种研究中。

8.2.2 人工同步化

人工同步化常用于体外培养细胞,又可分为选择同步化和诱导同步化两种类型。

选择同步化方法基于在随机细胞群体中,根据一些物理特性选择性地拣出处于某个特定的周期时相的细胞,其中主要有:①有丝分裂选择法:在单层培养细胞中,与贴壁牢固的间期细胞不同,分裂期(M 期)细胞呈圆球状隆起,贴壁附着力减弱,如稍加振荡,M 期细胞会脱离器皿壁悬浮于培养液中,离心收集 M 期细胞。此法的优点是细胞不受药物等的伤害,且同步化程度高,缺点是 M 期细胞收率较低;②活细胞离心淘洗法:细胞在其周期生长过程中,体积逐渐增大,因此,处于周期不同时相的细胞体积不同,而细胞沉降速度与细胞体积、密度和形状有关,故可用沉降法进行分离。该法进行时需用专门的设备,如离心淘洗转子等,通过该法最后可依次淘洗出体积不同的处于不同周期时相(G_1、S、G_2 + M 期)的细胞。其优点是能选择性地同时获得处于不同周期时相的同步化细胞群体,且分离速度快、时间短,对活细胞的影响也最小。目前该法已广泛用于分离培养细胞、细菌、酵母、血细胞、骨髓细胞等。

诱导同步化方法的特点是细胞通过药物等处理后诱导为同步化的细胞群体,其中主要有:①DNA 合成阻断法:运用 DNA 合成抑制剂,可逆地抑制 DNA 合成,但不影响其他周期时相细胞的周期运转,最终将细胞阻抑在 G_1/S 交界处,获得同步的 S 期细胞。羟基脲、5-氟脱氧尿嘧啶、过量的胸腺嘧啶核苷(TdR)均可通过抑制 DNA 合成使细胞同步在 G_1/S 期交界处,但其中以过量 TdR 对 S 期细胞的毒性较小,阻断效果较好,特别是 TdR 双阻断法是最常使用的方法。该法具体过程如下:将过量 TdR(2 mmol/L 或更高一些)加入细胞中,由于 DNA 合成被抑制,S 期细胞不能前进,而其他细胞沿细胞周期运转,最后被积累在 G_1/S交界处(第一次阻断),随后通过洗涤,再加入新鲜培养基,进行释放,细胞进行周期运转,当释放时间大于 t_S 时,就使得所有被积累在 G_1/S 细胞及原先停留在 S 期细胞都能通过 S 期;尔后第二次给予过量的 TdR(第二次阻断),则使上述细胞群体通过 G_2 + M + G_1 期的运转,最终被阻断在 G_1/S 交界处,继之,再按照上述方法解除抑制,进行释放,就能得到较高同步化的 S 期细胞(图 8-2)。但这种方法仅适用于 $t_{G_1} + t_{G_2} + t_M > t_S$的细胞。该法的优点是同步化程度高,适用于任何培养体系;其缺点是诱导过程造成细胞非均衡生长,可能会导致所得同步化细胞群体在周期上表现出有所改变,有时也可能会出现染色体异常等现象;②有丝分裂期阻断法:一是 N_2O 阻断法[氧化亚氮(N_2O)气体是一种有效的有丝分裂中期细胞阻断剂],其具体过程如下:将对数生长贴壁细胞培皿放入一个不锈钢高压罐中,通入 N_2O,将罐放在恒温箱中(37℃),经十余小时,细胞被大量阻断在有丝分裂中期,振荡收集 M 期细胞。其作用原理可能是 N_2O 暂时性地干扰了 M 期细胞纺锤体的功能导致细胞阻断于

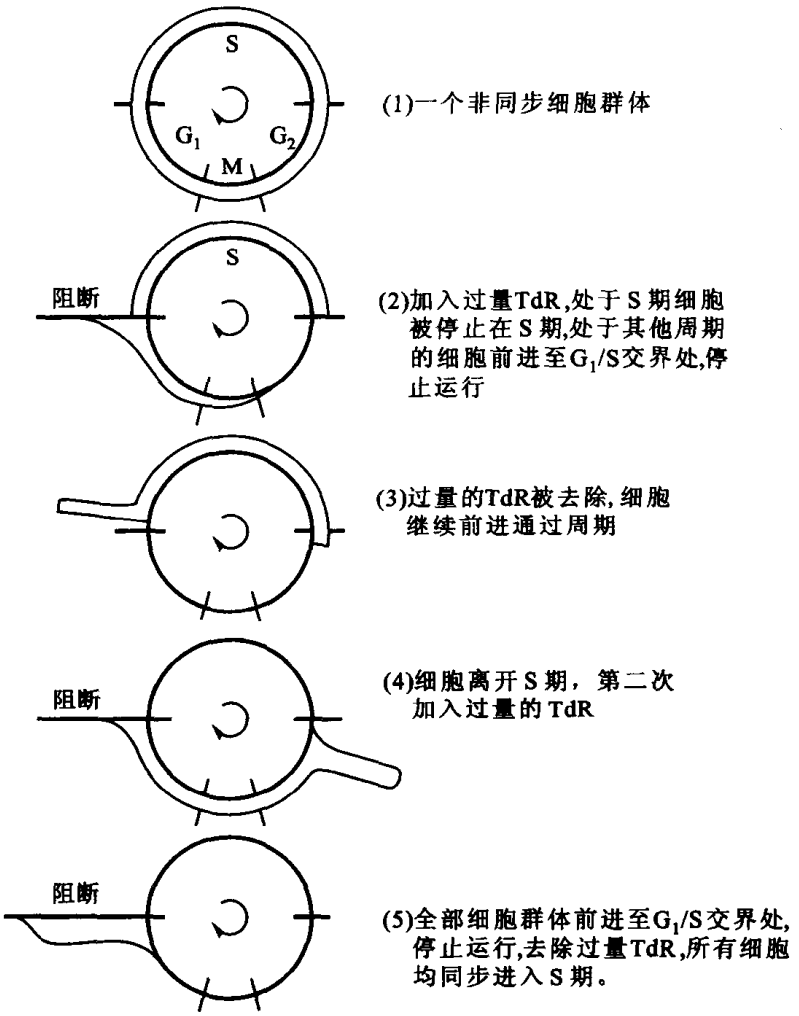


图 8－2 过量 TdR 双阻断法使细胞同步化图解

M 期。该法的优点是同步化效率高,对细胞生理效应影响小,经释放后,细胞能正常地由 M 期向 G_1 期前进;缺点是该法用于上皮型细胞能取得满意效果,但对于非上皮细胞同步效果则较差。另一方法是通过一些药物(如秋水仙素或秋水仙酰胺)能阻抑微管聚合从而抑制有丝分裂装置的形成,将细胞阻断于有丝分裂中期。虽然该法对细胞不平衡生长的问题不很明显,但是该种阻断法的可逆性较差,当阻断时间较长时,阻断释放后不少细胞会进行异常分裂。

上述药物诱导同步化方法可相互配合使用,能取得更好效果,如在有丝分裂中期阻断法中,细胞可先进行一次 TdR 阻断后,再放置入 N_2O 中进行处理,则能收获更多的 M 期细胞,取得更佳的同步化效果。

8.3 细胞周期时相的主要事件

8.3.1 细胞周期检验点

已知细胞周期是高度准确和有组织的时序调控过程。该过程一方面依赖于细胞内部由

CdK 激酶(cyclin－dependent kinase)和周期蛋白(cyclin)为中心的引擎分子周期变化所诱发的一系列事件的顺序发生,以及与细胞周期有关的基因之有序表达,从而使细胞周期能严格按照 $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ 顺序循环进行;另一方面在细胞周期正常事件受到影响时采取有效措施,通过检验点的反馈调控机制,监视和调控周期时相正常运转,从而保证细胞周期中的关键事件高度准确地完成。细胞周期检验点(cell cycle checkpoint)受制于一系列特异或非特异环境信号的影响,是基于一系列基因及其产物对外界信号的反应。因此有人提出检验点是信号转导通路,它可能包含下列数种组分:起始信号(signal),检验异常事件发生的感受器(sensor),对异常信号转导的转导者(transducer)和细胞周期引擎成分的效应器(effector)。细胞周期检验点普遍存在于高等真核生物和酵母细胞中。许多检验点通路最初是通过分析酵母中 *cdc*(cell division cycle 细胞分裂周期)基因突变株鉴定出来的。如存在于酵母细胞中 DNA 合成开始前的启动点(start)和高等真核生物 G_1 期中的 R 点或限制点(restriction point)、DNA 损伤检验点(DNA damage checkpoint)、DNA 复制检验点(DNA replication checkpoint), G_2/M 检验点、M 中期至 M 后期又称纺锤体组装检验点(spindle assembly checkpoint)等。当细胞周期进行过程中发生异常事件时(DNA 损伤,纺锤体组装异常等),可分别通过这些检验点的作用及时阻断周期进程,使细胞获得修复时间,以保证周期高度准确地进行正常运转。如细胞 DNA 受到损伤时,通过 DNA 损伤检点对 DNA 损伤作出迅速反应,将细胞阻断在 G_1 期和 G_2 期,同时诱导修复基因的转录,保证了细胞在 DNA 损伤未修复前不能从 G_1 期进入 S 期和从 G_2 期进入 M 期,因此防止了由于损伤的碱基的拷贝所引起的基因突变和损伤 DNA 的复制引起的染色体高频率重排。在哺乳动物中已知有 p 53、ATM(ataxia－telangiectasia)、Cdk 抑制因子(Cdk inhibiter, CKI)、p 21 等在 DNA 损伤检验点中发挥作用(详见细胞增殖调控因素)。实验表明,DNA 复制后染色体的正常分离需要有丝分裂期各事件的正常完成,如纺锤体的正确组装、染色体通过动粒与纺锤体两极的正确相连、染色体排列在赤道板上等。纺锤体组装检验点在保证上述事件正确完成的情况下,细胞开始染色单体的分离,从 M 中期进入后期,完成有丝分裂。已知纺锤体组装涉及到许多成分,其中任何一个成分的变化或缺陷均可作为损伤信号而被纺锤体组装检验点所检测,并通过对蛋白质磷酸化、去磷酸化和蛋白质水解作用等事件之调节,影响染色单体的分离,导致细胞不能从 M 中期进入后期(详见后)(图 8－3)。因此,不难看出,通过细胞周期检验点的调控使细胞周期能正常运转,从而保证了遗传物质能精确均等分配,产生具有正常遗传性能和生理功能的子代细胞,如果上述检验点调控作用丢失,就会导致基因突变、重排,使细胞遗传性能紊乱,增殖、分化异常,细胞癌变甚至死亡。

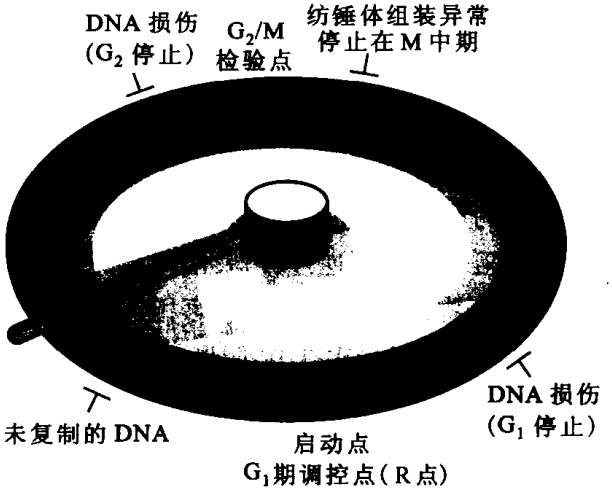


图 8－3 细胞周期检验点调节与周期前进示意图
由于射线或化学修饰造成的 DNA 损伤,阻止 G_1 期进入 S 期和 G_2 期进入 M 期,有丝分裂纺锤体组装不正常,细胞不能从 M 中期进入 M 后期等(仿 B. Alberts, 1994)

8.3.2 G_1 期

一般认为,在 G_1 期细胞中物质代谢活跃,进行 RNA 和蛋白质合成,细胞体积增大,特别是与 DNA 合成启动有关。近年来通过实验发现在酵母等生物中,染色体起始 DNA 复制前,要求 G_1 期染色质处于复制前感受(competent)状态,该状态需要一个由多种蛋白质分子形成的前复制复合物(pre－replication complex, pre－RC)结合在复制起点上。实验表明,处于前复制状态的染色质必须在 S 期活化因子即 S 期促进因子(SPF)作用下才能起始 DNA 复制(详见 S 期)。

近年来在真核生物细胞周期运转的调控研究中,最为引人注目的是发现了周期蛋白家族和周期蛋白依赖激酶(cyclin－dependent kinase, Cdk)家族及它们在周期运转调控中的重要作用。Cdk 与周期蛋白结合形成异源二聚体的复合物,具有蛋白激酶活性。每种 Cdk 激酶结合不同类型的周期蛋白,分别在细胞周期不同时相中发挥作用,它们被称为细胞周期引擎(engine)分子(详见 8.6 细胞增殖调控因素)。有关 Cdk 激酶和周期蛋白在 G_1 期的作用始于对低等真核生物酵母的研究。正如前述,在高等真核生物 G_1 期中存在一个 R 点或调控点,而在酵母细胞中 DNA 合成前的调控点则被称为启动点(start),细胞必须通过 G_1 期中的 R 点或启动点才能进入 S 期。通过温度敏感突变株研究表明,在芽殖酵母(*S. cerevisiae*)中 *cdc*28 基因的突变导致细胞不能通过启动点和进入 S 期。类似地,在裂殖酵母(*S. pombe*)中,与 *cdc*28 高度同源的 *cdc*2 也具有同样的作用。这两个基因编码的蛋白产物具有蛋白激酶活性,而且均表现出对周期蛋白的依赖性。通过温度敏感突变株、基因克隆等实验技术,在芽殖酵母中已发现 3 个 G_1 期周期蛋白,即 Cln1, Cln2 和 Cln3。实验表明,这 3 种 G_1 期周期蛋白与 Cdc28 蛋白结合形成具有蛋白激酶活性的复合物被称为 S 期促进因子(S phase－promoting factor, SPF),作用于 G_1 期向 S 期的推进。当上述 3 个周期蛋白基因——*cln*1, *cln*2 和 *cln*3 被敲除时,细胞不能通过 G_1 期最终导致死亡。继之,20 世纪 90 年代以来相继在高等真核细胞如哺乳动物和人细胞中鉴定出 G_1 期周期蛋白 C、D、E 等。它们分别通过与 Cdk 家族中不同成员结合,作用于与 S 期启动有关的基因转录,促使细胞通过 R 点并从 G_1 期向 S 期转移(详见 8.6 细胞增殖调控因素)。

近年来研究表明,真核细胞如酵母等从 G_1 期向 S 期过渡时需要 S 期 Cdk 激酶抑制因子如 $p40^{sicl}$的降解,才能使 Cdk 激酶表现出活性并进一步作用于 DNA 合成的起始与进行(详见 8.6 细胞增殖调控因素)。

已有资料表明,G_1 期中合成 RNA 和蛋白质,这是细胞进入 S 期的必需条件之一,分别运用 RNA 和蛋白质合成抑制剂(如低剂量放线菌素 D 和嘌呤霉素等)均可抑制细胞从 G_1 期向 S 期的转移。已知一些重要蛋白质的合成对于 G_1 期细胞进入 S 期是必须的,如钙调素、G_1 期周期蛋白及与 DNA 合成起始和进行有关的酶蛋白等。钙调素(calmodulin, CaM)从 G_1 期开始积累,至 G_1/S 交界处升高,S 期达峰值。它与细胞增殖密切相关,如在 G_1/S 进程中,钙调素通过钙调素结合蛋白直接参与 DNA 复制酶系作用于 DNA 合成,它也可通过作用于细胞周期引擎分子(如周期蛋白 A 等)作用于 G_1/S 转移与 S 期进程。钙调素不仅在 G_1/S 进程,而且在 G_2/M 和 M 中期/后期进程中也发挥其调控作用。实验表明,高水平的钙调素促进上述 3 个位点的进程;反之,钙调素水平的降低则阻抑其进程。在 G_1 期中一些与周期进行有关的蛋白质磷酸化也与周期的正常运转有关,如 H1 组蛋白磷酸化增加,它可

能通过改变染色质结构和有利于促进 S 期 DNA 合成期间子代 DNA 的分离有关。

8.3.3 S 期

实验表明,遗传物质(DNA)的复制、组蛋白和非组蛋白等染色体蛋白质的合成及染色质蛋白质与 DNA 包装为核小体等染色质结构是 S 期中重要的分子细胞生物学事件。

8.3.3.1 真核生物染色体 DNA 复制的特点

在真核生物中,DNA 复制原则上和细菌基因组 DNA 复制相似,如半保留复制方式、冈崎片段复制的特点、复制叉的生长方式等。但与原核生物相比,真核生物染色体 DNA 要大得多,而且具有染色体 DNA 与组蛋白构成核小体的特征结构,因此,真核生物在 DNA 复制的时间和空间上均具有自身的特点。

1. 多个复制起点和复制起点成簇活化,组成复制单位。通过放射自显影技术和电镜观察等均表明了 DNA 复制时在多个复制起点上 DNA 双链解开并以复制叉方式向两个方向进行延伸与生长,当与相邻的复制叉相遇时,终止其推进,以这种方式完成 DNA 合成(图 8-4)。研究资料表明,在高等真核生物中 DNA 复制起点成簇活化,组成复制单位(replication unit)。复制单位由数个多至上百个复制起点组成。复制单位是受协同调节的。在复制单位中,复制起点相隔的距离在不同类型的细胞和不同个体的发育阶段中表现出不同。S 期长短主要取决于复制起点活化与利用的数目,因为复制叉前进速率大致是相同的。如在果蝇早期卵裂中,DNA 合成复制起点被活化数远高于生长的成熟细胞,相邻复制起点间的碱基对也明显减少,因此 S 期时间也相应缩短。

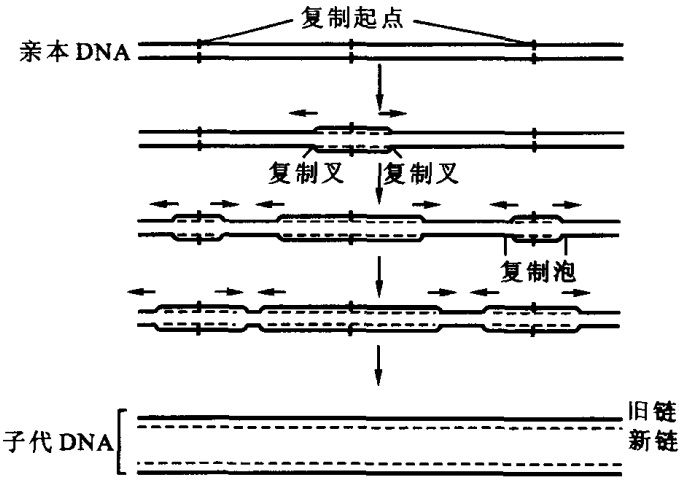


图 8-4 真核生物染色体 DNA 复制模式图示几个邻近的复制起点

2. 染色体末端的特殊结构——端粒的复制特性(见第 7 章细胞核与染色体)。

3. S 期 DNA 复制的不同步。已有资料表明,DNA 分子上的复制起点是在 S 期中不同时间被启动的。通常情况下,大多数具有转录活性的常染色质复制较早,而异染色质则在晚 S 期复制,如雌性动物钝化的 X 染色体等。通过对不同 S 期阶段复制的 DNA 浮力密度变化分析,反映出在不同 S 期复制的 DNA 碱基组分比例的改变。如早 S 期合成的 DNA GC(鸟嘌呤和胞嘧啶)含量较高,晚 S 期复制的 DNA AT(腺嘌呤和胸腺嘧啶)含量较高。一般认为,在细胞周期中,复制时间的差异在染色质区域、DNA 序列上表现出总是一定的。

8.3.3.2 前复制复合物(pre-RC)的组装和去组装在 S 期调节中的作用

早期通过细胞融合实验,观察到同步的 G_1 期人 HeLa 细胞与 S 期细胞融合,可诱发 G_1 期核 DNA 合成。但在 S 期与 G_2 期融合的细胞中,S 期细胞不能导致 G_2 期核中 DNA 之合成;在 G_1 期与 G_2 期融合的细胞中,G_2 期细胞也不能活化 G_1 期核中 DNA 的合成。上述实

验一方面表明了S期活化因子在S期启动中的重要作用，另一方面也表明了S期活化因子的作用与间期染色质所处的状态是密切相关的。近年来，特别是通过对酵母细胞的研究，对阐明上述现象的分子机理调控取得了一些新的进展。

实验表明，在真核细胞中存在一个与DNA复制起始密切有关的起始识别复合物(origin recognition complex, ORC)，它是一个多亚基的蛋白质复合物，为DNA复制起始所必需。它为蛋白质相互间作用提供了位点。ORC与复制起点的结合贯穿于整个周期中(图8-5)。前已叙及，S期染色质DNA复制的起始，要求染色质处于"感受"状态，即在DNA复制起点上结合一个前复制复合物(pre-RC)才能进行DNA复制。现已知组成pre-RC的蛋白质有ORC、Cdc6(芽殖酵母中)、Cdc18(裂殖酵母中)和MCM蛋白(mini-chromosome maintenance proteins)等。实验表明，在芽殖酵母中，缺少Cdc6蛋白时由于不能形成前复制复合物，故不能起始DNA复制；在裂殖酵母中，Cdc18参与了pre-RC的组装，作用于DNA复制起始比率；MCM蛋白是个家族，它存在于所有真核细胞中，已表明为非洲爪蟾和酵母的DNA复制所必需。它与Cdc6、ORC等共同参与了染色质前复制复合物之组装。一般说，当细胞离开M期，M期Cdk活性下降时，允许这些蛋白连结附着在复制起点上组装为前复制复合物；当细胞前进至晚G_1期时，S期Cdk激酶活性升高，它可通过活化一系列与DNA复制有关的酶和蛋白质基因的转录和表达等事件，起始DNA复制，当DNA复制一旦

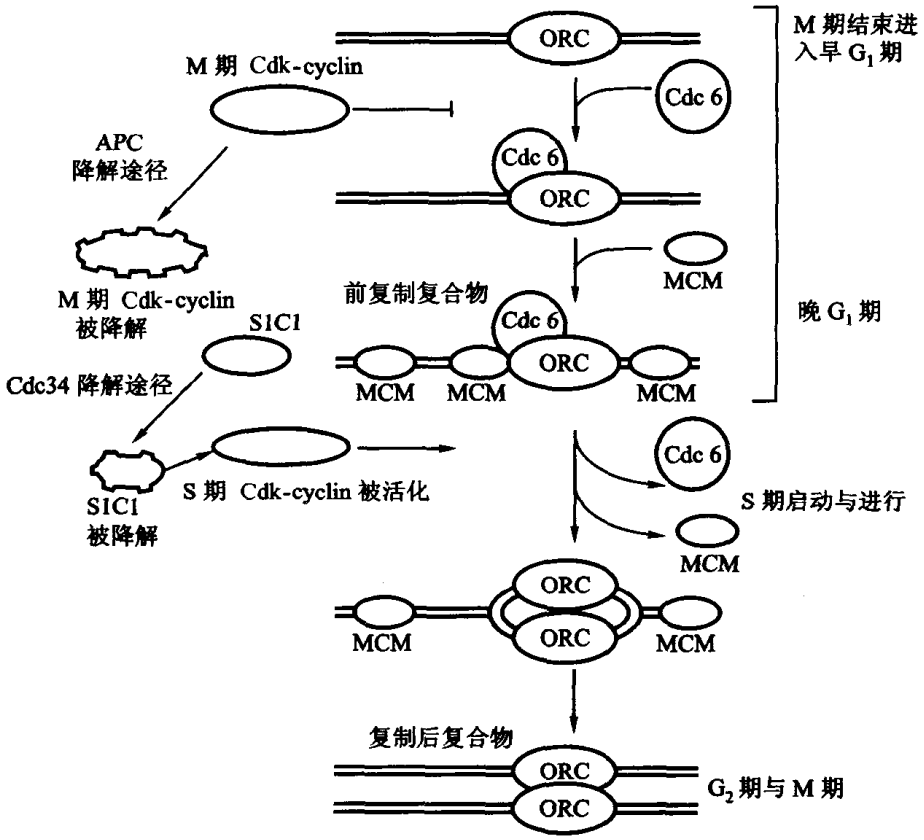


图8-5 真核生物染色体前复制复合物(pre-RC)组装过程示意图

在细胞周期过程中，复制起点识别蛋白复合物(ORC)与染色质DNA复制起点结合，在细胞周期Cdk激酶和周期蛋白(cyclin)的活性调节下前复制复合物(pre-RC)被次序地组装(如Cdc6、MCM蛋白等)。DNA复制起始后，阻抑了任何进一步的前复制复合物的组装。复制后复合物形成，其结果是阻止了G_2期染色质重新复制DNA。SIC1：S期Cdk激酶抑制因子；APC：后期促进因子复合物(引自B. stillman, 1996)

被开始后，导致了 pre－RC 去组装，一方面由于紧跟复制之起始，一个特定的泛素连接的蛋白水解作用导致 Cdc6/Cdc18 之降解，另一方面通过 S 期 Cdk 激酶活性使得 MCM 家族蛋白磷酸化，磷酸化的 MCM 蛋白降低了与染色质的亲和性，不能与 ORC 复合物相互作用，从而导致了前复制复合物的钝化。因此，在 S 期中 DNA 复制起始后，阻抑了任何进一步的前复制复合物的形成，在复制起点上，形成了一个复制后复合物（post－replication complex），其结果是阻止了 G_2 期染色质重新复制 DNA。只有当细胞进行有丝分裂后，M 期 Cdk 激酶活性下降，Cdc6/Cdc18 蛋白重新积累，与 MCM 蛋白等一起与 ORC 结合，重新组装为前复制复合物，使 G_1 期染色质获得了“感受”状态，从而开始了第二个细胞周期（图 8－5）。通过上述作用机制，保证了在一个细胞周期中 DNA 复制起点仅只能被利用一次，即是说在一个细胞周期中 DNA 仅复制一次。

8.3.3.3 组蛋白的合成与核小体的组装

实验表明，组蛋白的合成主要在 S 期，在 S 期中，核内合成 DNA，细胞质中合成组蛋白。组蛋白合成与 DNA 合成之间关系呈现出“联动装置”，如在 S 期末，DNA 合成停止时，大量的组蛋白 mRNA 就成为非常不稳定，在几分钟内降解；又如当用 DNA 合成抑制剂（如羟基脲等）处理 S 期细胞时，组蛋白合成也很快停止，其 mRNA 水平也迅速降低。看来，通过上述“联动装置”可调节游离组蛋白的水平，保证组蛋白形成的数量与新合成的 DNA 数量相匹配。

S 期中，有关组蛋白与 DNA 进行核小体组装的过程与机理，科学家们提出了多种解释。研究资料表明，S 期中新合成的 DNA 在 2 min 内很快就已和组蛋白参与核小体的组成；组蛋白合成后被转移至核内，共同完成核小体的组装。有人认为当 DNA 复制时，复制叉向前推进必须通过亲本核小体。可能在 DNA 复制时，每个亲本核小体暂时解开折叠，形成两个“半核小体”（half－nucleosome），在 DNA 聚合酶作用下合成 DNA。有人认为亲本核小体八聚体（即归八聚体）位于复制叉前导链一侧的子代 DNA 螺旋，构成新的核小体核心的组蛋白八聚体则组装在 DNA 复制叉后随链的子代 DNA 螺旋上。但也有人认为亲本核小体八聚体可能位于其中任一个子代 DNA 螺旋上（图 8－6）。实验表明，当复制叉通过几分钟后，新的组蛋白就被组装在复制叉一侧的子代 DNA 螺旋上，当用蛋白质合成抑制剂（如环已亚胺等）处理时，通过电镜可观察到在复制叉一侧是很长的无组蛋白八聚体的 DNA 分子。组蛋白合成后被修饰，进行磷酸化、乙酰化、甲基化和 ADP－

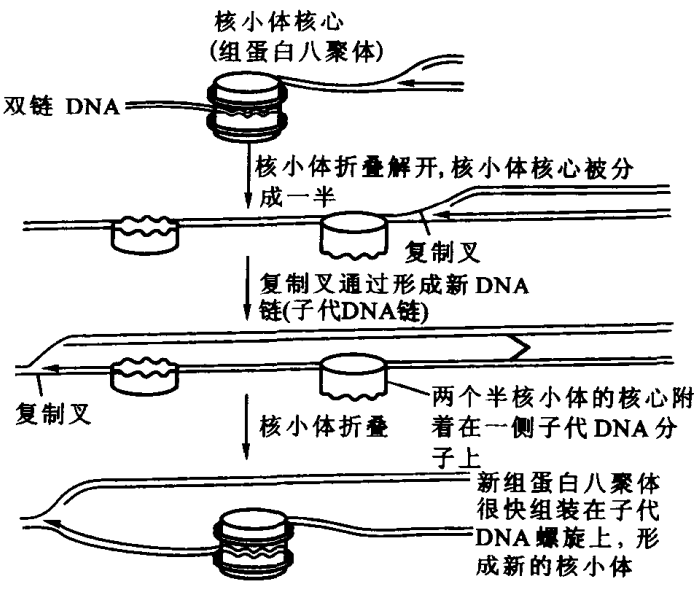


图 8－6 核小体解折叠为“半核小体”进行 DNA 合成及新核小体组装示意图

图中两个“半核小体”的旧组蛋白核心可能位于复制叉前导链一侧的子代 DNA 螺旋上。但也有实验表明它可能位于其中任一个子代 DNA 螺旋上（引自 Alberts，1994）

核糖基化作用，其中组蛋白的磷酸化和乙酰化被认为是在调节细胞周期运转和基因表达方面起重要作用。一般认为与细胞周期调节有关的是3种组蛋白的磷酸化，如H2A、H1、H3的磷酸化与染色质的凝集有关，组蛋白的乙酰化如H3、H4的乙酰化可能与基因转录活性调节有关。

8.3.4 G_2 期

G_2 期主要为细胞进入M期所需的结构及功能进行准备。如合成染色质凝集和有丝分裂装置构成所必须的组分等。研究资料表明，G_2 期完成了着丝点蛋白的复制。其中特别重要的是M期调控因子即成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF)在 G_2 期中逐渐形成并从非活性状态逐步转变为活化状态。已知MPF的组成物是M期周期蛋白B和Cdk激酶($P34^{cdc2}$)的组成物，在哺乳动物中，周期蛋白B在S期中起始合成，在 G_2 期中继续进行合成与积累，并与Cdk1激酶结合，在相关激酶和磷酸酶的作用下，形成活化的MPF，通过 G_2/M 检验点，使细胞进入M期(详见8.6细胞增殖调控因素)。

8.4 有丝分裂

细胞分裂保证了细胞增殖和生命的延续(图8-7)。它包含核分裂和胞质分裂(cytokinesis)两个过程。经过长期的进化过程，高等真核生物中核分裂主要是以比较

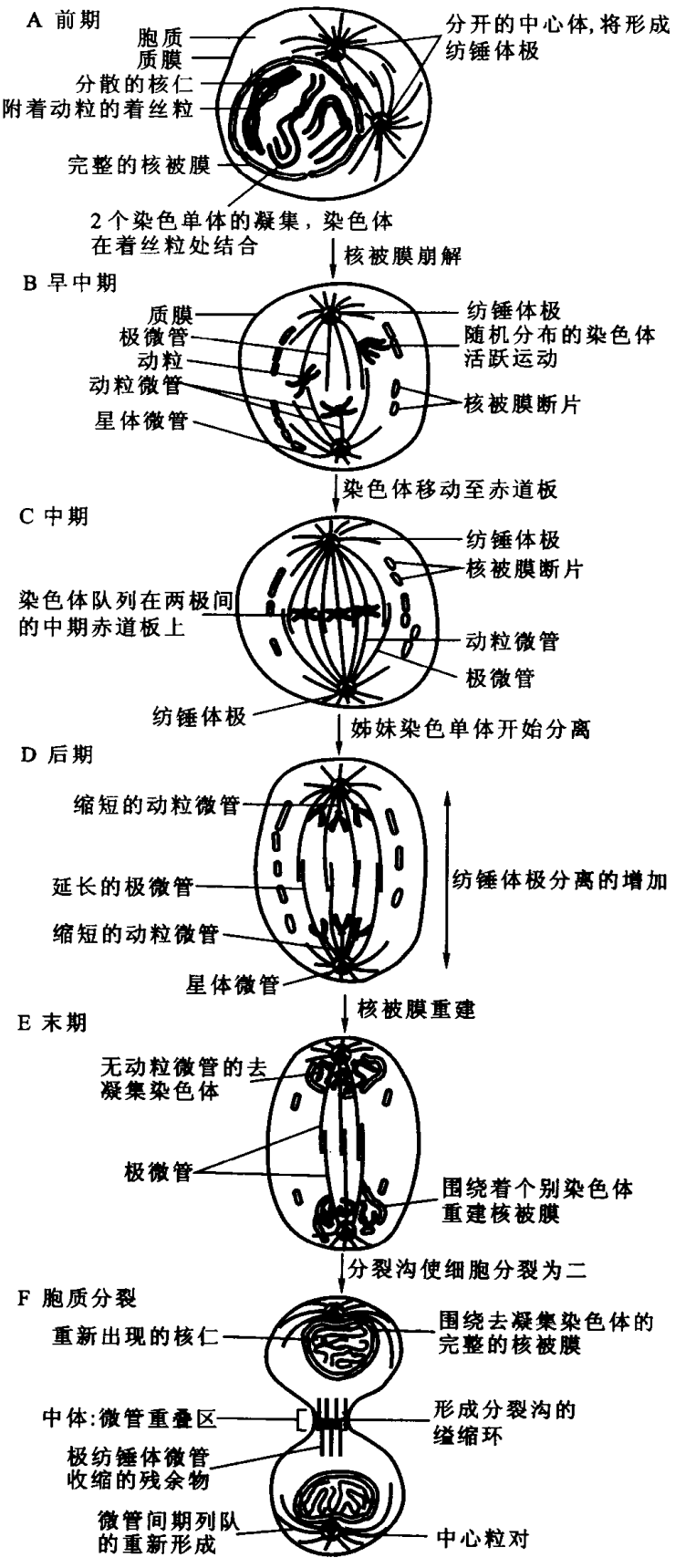


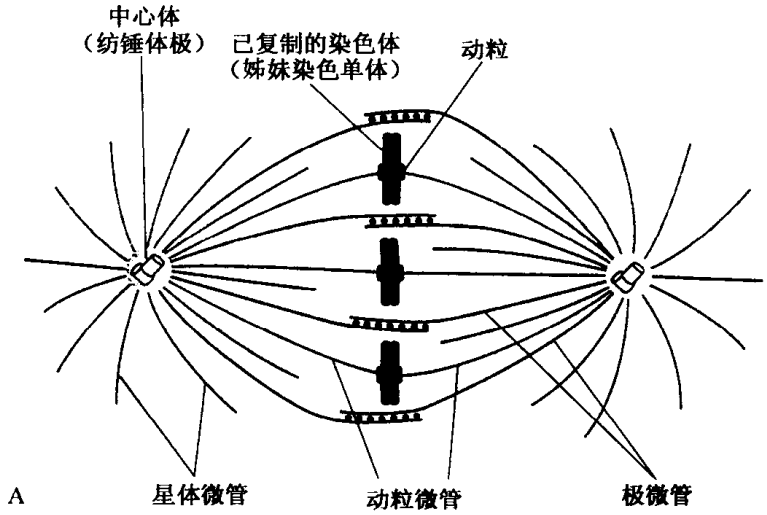
图8-7 动物细胞有丝分裂6个阶段示意图
(引自 B. Alberts, 1998)

完善的有丝分裂方式进行，通常又称为间接分裂。有丝分裂最早是 Flemming(1882)发现的。通过有丝分裂装置及一系列精确、复杂的生理过程，细胞可将在间期中合成的大分子特别是将已复制的载有遗传信息的染色体 DNA 精确地平均分配至两个子细胞中，从而保证了遗传性能的继承和稳定性。

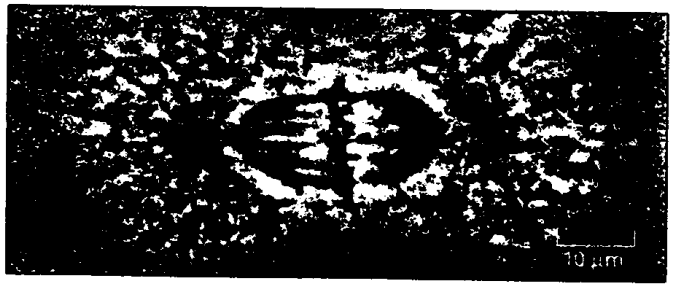
有丝分裂是细胞分裂的一系列事件连续发生和发展的过程。根据形态学特征通常人为地将动物细胞有丝分裂划分为 6 个时期：①前期(prophase)：主要特征是复制的染色质凝集和有丝分裂纺锤体开始在核外组装；②前中期(prometaphase)：核被膜崩解，纺锤体微管去接触染色体并与它们结合；③中期(metaphase)：有丝分裂纺锤体聚集所有染色体至纺锤体中心(赤道板)；④后期(anaphase)：已复制的两个染色单体同时分开，纺锤体缩短牵拉它们至细胞相对的极；⑤末期(telophase)：围绕两套已分开的染色体进行核被膜重组，形成两个分开的核；⑥进行胞质分裂，完成有丝分裂(图 8－7)。

8.4.1 前 期

前已叙及，该期主要事件是已复制的染色质凝集和有丝分裂纺锤体开始在核外组装。前期中染色质纤维凝集、缩短、变粗，已能观察到每条染色体含有两条染色单体的结构，并出现主缢痕(primary constriction)。正如前述，着丝粒位于主缢痕处，两条姊妹染色单体的 DNA 在此处联系在一起。动粒(又名着丝点)附着在主缢痕着丝粒上，动粒有 3 层结构，为动粒微管附着的部位。(详见第 7 章)。已知，纺锤体在前期开始组装，纺锤体是细胞分裂过程中的一种与染色体分离直接相关的细胞器。通常将有丝分裂时出现的由微管及其结合蛋白所组成的纺锤体(spindle)称为有丝分裂装置(mitotic apparatus)。它由 3 类微管组成，即星体微管(astral microtubles)、动粒微管(kinetochore microtubules)和极微管(polar microtubules)(图 8－8)。其中极微管在纺锤体中由一极通向另一极，但实际上绝大多数并不是真正连续，而是来自两极的微管在赤道板处互相搭桥，搭桥处微管相关蛋白可发挥连接作用。极微管在纺锤体极的一端是微管的负极，而远离纺锤体极的一端则是微管的正极。动粒微管是指微管一端由极部发出，而另一端结合至着丝点(动粒)上。实验表明，有丝分裂装置在维持染色体的平衡、运动和分配中发挥重要的作用。近年来在其作用机理、特别是微管及其结合蛋白等方面取得了重要的进展。前期中纺锤体开始组装，微管在中心体(centrosome)周围开始大量装配。中心体是动物细胞内与微管装配和细胞分裂直接有关的一种细胞器，中心体与其周围的微管一起被称为星体(aster)。中心体为中心粒(centriole)和中心粒周围物质(pericentriolar material, PCM)组成。PCM 也被称为中心体基质。在动物细胞中中心粒并非是颗粒状结构，通常是一对互相呈直角排列的圆筒状小体，直径约为 0.25 μm，埋藏于邻近核膜的均匀的基质中，由九组纵行三联微管有规律地排列围成，横断面上，九组三联微管似风车的旋翼(图 8－9)，在一对中心粒的周围是一团透明的，不定形的中心粒周围物质即 PCM。实验表明，PCM 是具有微管组织中心(microtubule organizing center, MTOC)作用的部分。它含有一套中心体特异性蛋白，可能是中心体最关键部分。间期时以 PCM 为核心向胞质发出微管并延伸至细胞边缘。研究资料表明，中心体要经过一系列发育过程，称为中心体周期，才能达到成熟并具有 MTOC 的作用，通过中心体外组装纺锤体的实验证实了 MTOC 的功能在间期弱、有丝分裂中期很强，该现象也表明了有一个成熟过程。一般说，G_1 期细胞中存在两个互相垂直的中心粒，从 G_1 期末至 S 期，在邻近每一个母中心



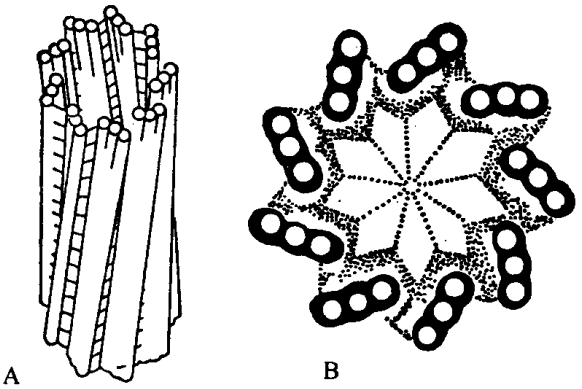
A



B

图 8－8 有丝分裂纺锤体具有的 3 种不同类型微管图解
A. 图示一个附着染色体的纺锤体；具有星体微管、动粒微管和极微管 3 种不同类型（事实上，染色体要比图示大得多）；B. 像差显微照片，图示中期分离的有丝分裂纺锤体，可见染色体排列在赤道板上

粒的基部与其成直角方向复制出一个子中心粒，从晚 G_2 期到 M 期，子中心粒不断长大并逐渐分离，进入有丝分裂前期时，每个中心粒对已分离成为一个生长辐射状微管的核心（即星体）。开始时在接近核被膜处两个星体并排在一起，至晚前期时，两个中心体分离移至两极，星体之间相互作用的极微管伸长，组成了带有两极外形的纺锤体（图 8－10）。在上述中心体周围微管的装配和中心体的分离与纺锤体延伸与拉长过程中，需要一些蛋白参与作用，如已知中心体周围物质中的特异的 γ 微管蛋白等参与了中心体周围微管的装配，移动素类蛋白（kinesin－related proteins, KRPS）和细胞质动力蛋白（denein）则在中心体的分离和纺锤体延伸与拉长的过程中发挥作用。实验表明，中心粒本身可能对组织微管不起作用，如植物中心体缺少中心粒但仍能发挥作用，正如前述，大多数生物中，发挥作用的关键部分是中心体基质 PCM。植物细胞没有星体，而是由许多微极（mini poles）组织纺锤体。此外，当细胞进入前期末时，核仁消失，核纤层蛋白磷酸化引起核纤层与核膜开始崩解（图 8－7A）。



A　　B

图 8－9 中心粒
A. 中心粒立体结构示意图；B. 中心粒横断面示意图

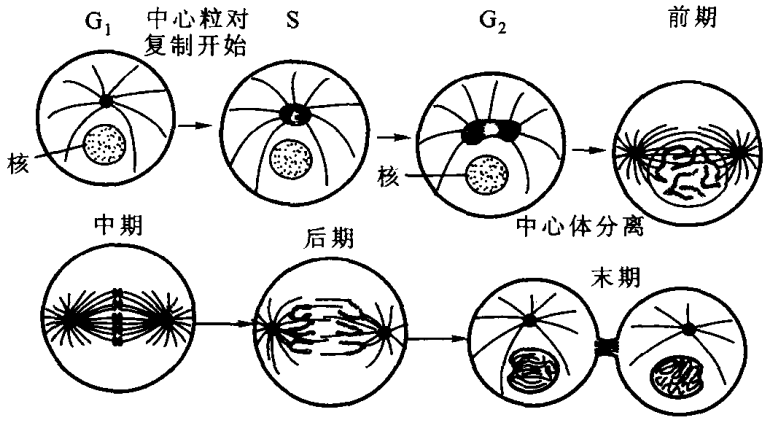


图 8－10　中心体周期示意图(引自 B. Alberts, 1994)

8.4.2　前中期

该期的主要事件是核被膜崩解,核纤层解聚,纺锤体进一步装配和纺锤体微管与染色体接触并与其结合(图 8－7B)。前中期开始,核被膜崩解,形成小囊泡,核周围的纺锤体进入细胞中心区域,一部分纺锤体微管自由端结合到染色体动粒上,形成动粒微管。该期中,染色体剧烈地活动,在两极之间往返地翻滚和振荡,纺锤体微管去"捕获"这些染色体,通过动粒微管将染色体连接至纺锤体极上(图 8－7B)。至于动粒微管的自由端去"捕获"染色体上不同侧面的动粒过程则是随机进行的。最后,两侧相反方向的力量之平衡,导致染色体排列在赤道板(equatorial plate)上,细胞也随之进入中期。在该期中,大量微管与动粒连接,其数目随细胞种类不同而异,如每个人细胞动粒可结合 20～40 根微管,而酵母细胞中每个动粒结合的微管则少得多。

8.4.3　中　期

该期的主要事件是染色体排列在有丝分裂纺锤体中心赤道板上(图 8－7C)。中期有丝分裂纺锤体形成(图 8－8B)。有关染色体排列在赤道板上的机制有多种假说,其中有"牵拉假说"(pull hypothesis)和"外推假说"(push hypothesis)。牵拉假说认为,染色体向赤道板方向移动与动粒微管之延伸所产生的牵拉有关。因此当动粒微管越长时,则拉力也越大,一旦来自两极的动粒微管的牵拉力相等时,染色体就被稳定在赤道板上(图 8－11A)。持外推假说观点者认为染色体向赤道板方向移动与星体通过对染色体的外推所产生的排斥力有关;排斥力随染色体与星体的距离不同而变化,染色体距离星体愈近,星体对染色体的排斥力愈大。当来自两极由于外推所产生的排斥力相等时,染色体被稳定在赤道板上(图 8－11B)。通常认为上述两种机制可能协同作用,在染色体排列在赤道板上发挥其调节功能。同时,必须指出在上述染色体排列和中期有丝分裂纺锤体形成的过程中包含了微管连续生长和缩短,即一个不断平衡地进行微管蛋白的组装和去组装与微管马达蛋白的作用。实验表明,中期纺锤体微管具有动力学特点,如同极微管一样,动粒微管也处于组装与去组装的动态中。如果将管蛋白注入有丝分裂中期细胞时,发现它们不断组装到微管近动粒的一端(即正端)(图 8－12)。实验表明,当微管蛋白的加入,在秋水仙素(破坏微管)的作用下,发生微管的

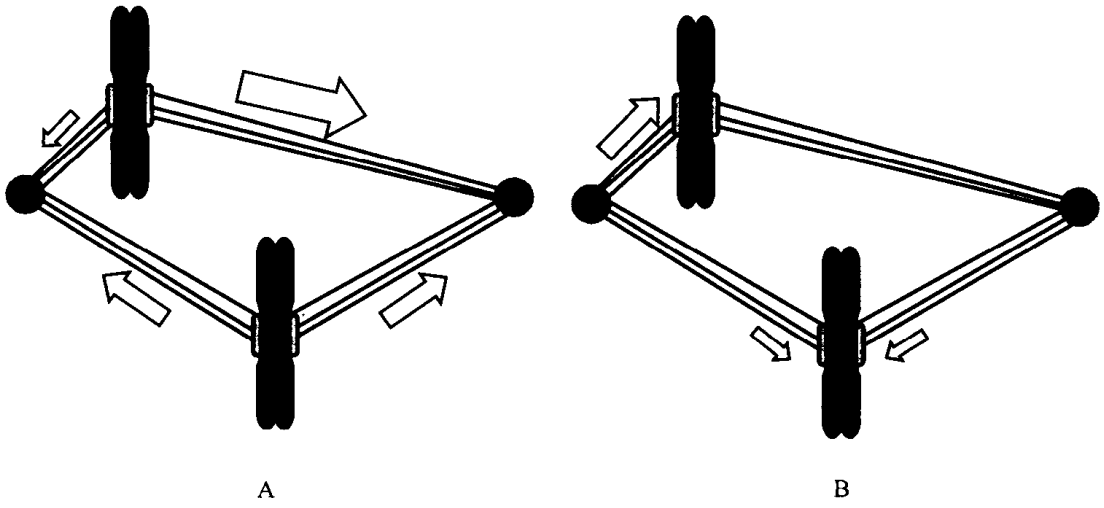


图 8－11 染色体排列在中期赤道板上的两种假说

A. 牵拉假说，染色体向赤道板方向移动与动粒微管之延伸产生的牵拉有关，牵拉力与动粒微管长度成比例；B. 外推假说，染色体向赤道板方向移动与星体通过对染色体的外推产生的排斥力有关，该排斥力随极距离增加而降低（引自 B. Allerts, 1994）

去组装，从而引起整个纺锤体很快去组装，直至纺锤体消失为止。此外，近年来，发现了一些蛋白质与染色体排列在赤道板上有关。如 Mad 蛋白和 Bub 蛋白，它们定位在前期和前中期染色体动粒上，它们可促使微管与动粒作用，与染色体装配至纺锤体有关。免疫荧光实验表明，当染色体被微管捕获时，位于动粒上的 Mad2 蛋白和 Bub1 蛋白消失；反之不被微管“捕获”的染色体动粒上存在上述两类蛋白，当所有染色体的动粒被纺锤体微管“捕获”和联结后，各个动粒上 Mad2 和 Bub1 蛋白消失，染色体排列在赤道板上。实验表明，M 中期时聚集在纺锤体赤道板上的染色体前后摆动，仍不断地调节它们的位置。在上述综合因素作用下，动粒微管作用于染色体上的力量持平，若用微束激光打击中期染色体动粒之一时，该侧动粒微管被打断，则这一对染色单体立即移向对侧动粒面向的一极，动粒微管缩短，类似后期发生的事件。该实验表明了在赤道板上染色体排列的支持是与其具有相当的张力密切有关的。

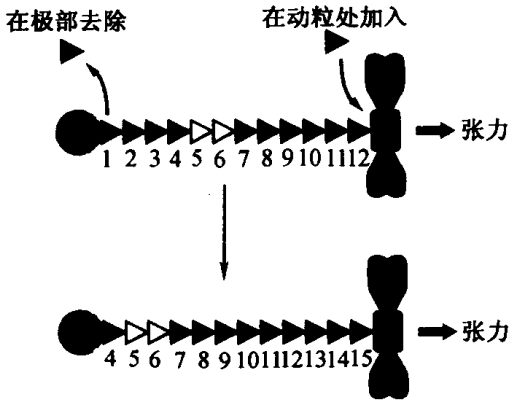


图 8－12 有丝分裂中期动粒微管动态变化示意图

在 M 中期管蛋白亚单位加入，动粒微管正端进行组装，同时在纺锤体极（即负端）进行去组装，产生管蛋白亚单位衡定的极性流动。微管维持恒定的长度并保持在相当张力下（引自 B. Alberts, 1994）

8.4.4 后 期

该期中主要事件为两个姊妹染色单体同时被分开，纺锤体将它们拉至细胞相对的极（图 8－7D）。前已叙及，中期染色体排列在赤道板上，其姊妹染色单体通过着丝粒联系在一起。

近年来的研究发现存在一些将染色单体连接在一起的粘连蛋白复合物(cohesin complex),如酵母中的 Smc1、Smc3、Scc1、Scc2 等,它们存在于染色体多个位点上,已知在非洲爪蟾中也存在 Scc1 的同源物,这些蛋白的作用维持染色单体的连接,这些蛋白的消失,可能与单体的分离有关。它们的消失与泛素 - 蛋白水解酶复合物系统作用途径有关,其机理在进一步探讨中。此外,也发现一些导致染色单体分离的蛋白,现将其统称为 separins,如酵母中的 ESP1 和 Cut1 等,并且在人和非洲爪蟾中均存在其同源物,后期抑制因子通过与这些蛋白结合阻抑染色单体分离,通过泛素 - 蛋白水解酶复合物系统作用途径使抑制因子降解,从而作用于染色单体的分离(详见 8.6 细胞增殖调控因素)。实验表明,染色单体联系被切断与着丝粒部分的分离会立即打破力的平衡,动粒受到不断解聚与缩短的动粒微管的牵引产生染色体向极移动,所有染色体以同样速率(约 1 μm/min 左右)移动。染色体在后期向极移动包含两个独立过程,被称为后期 A 和后期 B。在后期 A,动粒微管主要是靠动粒处即正端微管蛋白不断去组装与缩短(图 8 - 13A),导致附着的染色体向极移动;在后期 B,伴随着极微管的延长及彼此间的滑动,将两极间的距离推向更远,进一步作用于染色体的分离。极微管的延长是靠游离端(即正端)不断组装微管蛋白及在赤道面上极微管重叠部分微管纤维之间极向滑动。(图 8 - 13B),所有这些作用力被认为是与微管有关的蛋白(如马达蛋白等)之作用相关。上述两种过程对药物的敏感性不同也进一步表明了它们分别是两个完全独立的类型,如阻断后期 B 的药物不能阻断后期 A 的过程。通过免疫电镜胶体金标记的方法也观察到染色体的向极运动与动粒微管去组装密切相关。实验表明,在有丝分裂中期细胞中,胶体金颗粒标记在动粒部位的微管上,当染色体移向细胞两极,动粒端标记的微管缩短并最后消失,表明动粒蛋白受到调节使动粒微管去组装,从而推动染色体的向极运动。

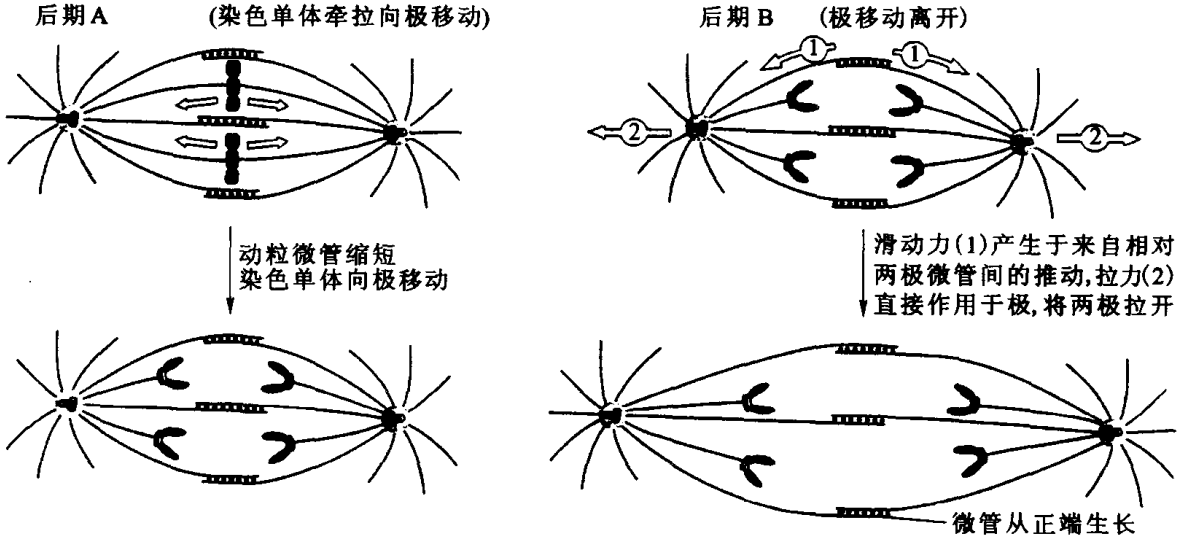


图 8 - 13　后期染色单体分开的两个过程示意图

后期 A:当动粒微管靠动粒端解聚时,子染色体向两极移动,驱使这个移动的力量主要在动粒;后期 B:两个纺锤体极分开是由于两种力量作用的结果,①极微管的延伸与滑动推动两个极分开,②在每个纺锤体极上,微管向外的力量推动两极彼此分开(引自 B. Alberts, 1998)

有关染色体运动的力量来源,一般认为与操作在动粒上的马达蛋白(motor proteins)有关。如在后期 A 中,染色体的向极移动有几种解释:一种认为与 M 期定位在极,纺锤体和动

粒部位的马达蛋白有关,这些分子在染色体运动中起着动力供应作用。前已叙及,微管的正端插入动粒的外层,呈袖筒状,微管蛋白分子在此端可以组装与去组装,微管蛋白分子和动粒蛋白分子有亲和性,在动粒中通过 ATP 水解提供的能量驱动结合的微管的马达蛋白向极部移动,从而拉动染色体向极移动。另一种看法认为染色体运动被微管去组装驱动,随着动粒端的微管去组装,动粒倾向于向极滑动,以恢复动粒与微管壁的结合而拉着染色体向极部运动(图 8-14)。在后期 B 中,极微管的延长与推动极部向两端移动,也被认为是与马达蛋白(如移动素类蛋白和动力蛋白等)起着动力供应的作用有关。在移动素类蛋白 KRP (kinesin-related protein)作用下,促使来自两极的极性微管在重叠区相互滑动,使两极之间的距离逐渐变长;动力蛋白(denein)等通过在星体微管与细胞膜之间的作用,推动星体向极移动,进一步将两极间的距离拉长。

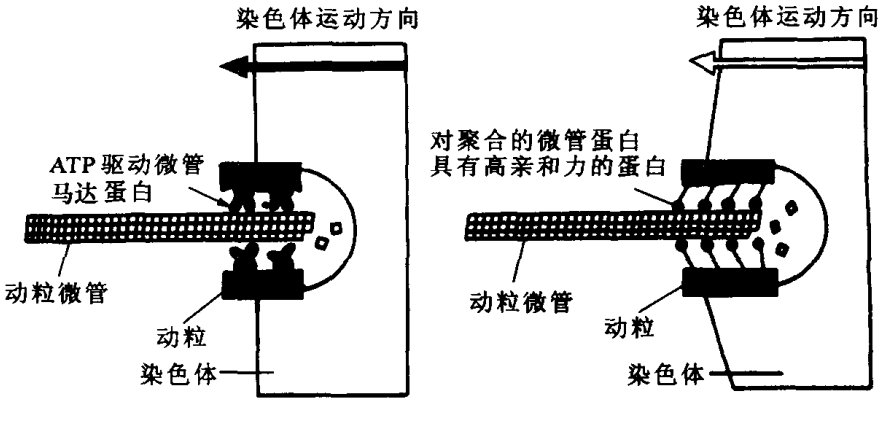


图 8-14 后期 A 中染色体向极移动的两种不同模型图解
A. 作为动粒部分的马达蛋白利用 ATP 水解的能量推动染色体沿着与它们结合的微管向极部移动,驱动微管去组装; B. 染色体运动被微管去组装所驱动,当管蛋白亚单位去组装,动粒倾向于向极部滑动,为了恢复与微管壁的结合而拉着染色体向极部运动(B. Alberts, 1994)

8.4.5 末 期

该期主要事件是,围绕两套平均分到纺锤体两极的染色单体,分别重组新的核被膜,并形成两个子间期核(图 8-7E)。前已叙及,在前期时核纤层蛋白的磷酸化导致核纤层和核被膜崩解,核被膜裂解为小膜囊泡;至末期时,围绕在染色体周围的核被膜囊泡结合到染色单体表面并相互融合,逐步形成较大的双层核被膜断片,最后形成完整的核被膜,并最终分别形成两个子细胞核。在该过程中,核孔被组装在核被膜上,在前期被磷酸化的核纤层蛋白的去磷酸化作用,导致重新构成核纤层,其中一直和核被膜断片相结合的核纤层蛋白 B (lamin B)被认为可能有助于核的重组装工作,核重组后,染色体开始解螺旋,染色质分散在子核中,核仁出现(图 8-15)。

8.4.6 胞质分裂

有丝分裂期发生的事件中,除了染色体和中心体精确复制和分开及子核形成外,其他组分如细胞膜、细胞器和胞质成分等也需要分开,它们亦是两个子细胞所必需,这些均需通过胞质分裂来完成(图 8-7F)。胞质分裂是细胞分裂的最后阶段,是一个精确的调节过程。一般说,核分裂和胞质分裂是相继发生的,存在细胞核周期和胞质分裂的信号偶联。如果只有核周期而未启动胞质周期,就会出现双核或多核细胞。胞质分裂经常开始在后期,但到末期两个子细胞核被形成后才能完成。胞质分裂过程可被归纳为 4 个主要步骤:出现分裂沟,

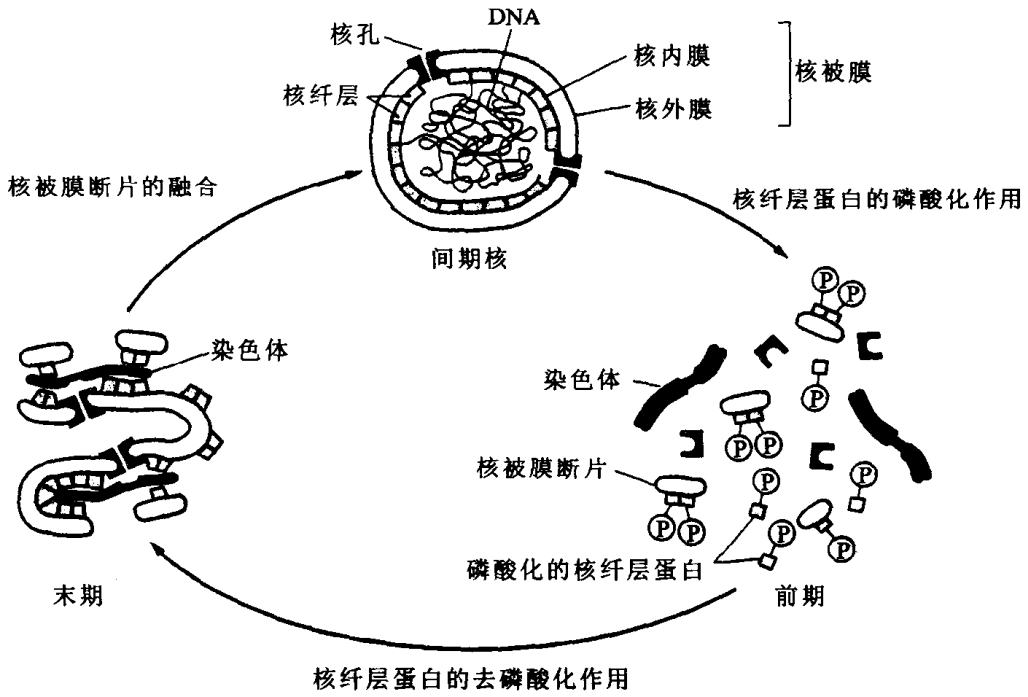


图 8－15　有丝分裂过程中核被膜崩解和重新构建图解

在前期，核纤层蛋白的磷酸化作用，使核纤层去组装，导致形成核被膜囊泡，在末期，核纤层蛋白的去磷酸化作用协助核被膜的重新构建（引自 B. Alberts, 1998）

肌动蛋白与肌纤蛋白的聚集和缢缩环的形成，缢缩环收缩和继之出现的细胞膜融合与两个子细胞的形成。从中、后期开始，一般在赤道板周围处胞质下凹成分裂沟，动物细胞分裂沟通常定位在赤道板附近，在该处形成环状缢缩——缢缩环（contractile ring）（图 8－16）。此时，在细胞中部微管增加，有非平行的微管束形成，并掺杂有浓密物质和囊状物，含多种蛋白如 TD－60 等，现将这一结构称为中体（midbody）。通过蛋白免疫荧光观察 TD－60，它似乎与启动胞质分裂有关。缢缩环逐渐加深直达中体。现认为动物细胞缢缩环主要由肌动蛋白和肌球蛋白组成，并形成收缩单位，缢缩环收缩，分裂沟逐渐加深，直至两个子细胞相互分离。实验表明，缢缩环收缩力的形成完全靠肌动蛋白纤维丝与肌球蛋白相互滑行所致，与肌肉收缩机制类似。但它是个短暂的结构，一个细胞分裂为二，它就完全去组装。分裂沟处收缩增强可能是由于局部收缩活性的增强，也可能是由于其他部位（如两极）张力降低所致。

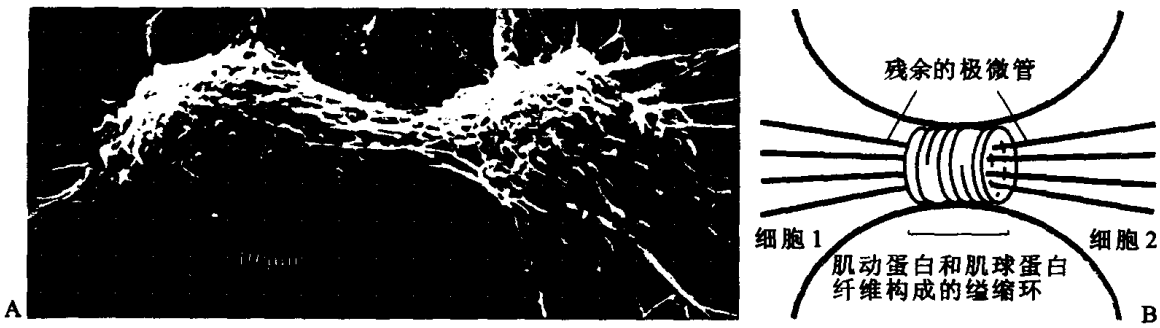


图 8－16　缢缩环

A. 哺乳动物细胞分裂最后阶段中的缢缩环的电镜图；B. 上述细胞中部区域示意图。图示缢缩环下方的质膜和残余的两套极微管（引自 B. Alberts, 1998）

通过实验发现牵拉的力量来自赤道接近分裂沟处，并且随着有丝分裂过程的进展，力量不断加强。实验表明，用肌球蛋白及肌动蛋白抗体处理可阻断收缩。并且用抑制肌动蛋白的细胞松驰素 B 处理也可抑制胞质分裂。此外，胞质分裂也和 ATP 分解、能量供应密切相关。近年来研究表明，Rho 超家族蛋白(Ras 相关的小 GTP 结合蛋白)对肌动蛋白细胞骨架有重要作用，现认为该超家族蛋白在胞质分裂相关过程中可能起着重要的信号传导甚至组织者的作用。此外，也观察到一些细胞中在将要断裂的细胞质胞膜处，存在大量泛素的弥散定位，表明泛素－蛋白水解酶复合物系统(UPP)可能参与了细胞的胞质断裂过程，通过 UPP 降解系统选择性降解一些结构成分，缢缩环进一步收缩从而完成胞质分裂过程。如 HeLa 细胞胞质分裂过程中，胞质分裂沟具有强烈的泛素免疫荧光反应。

前已叙及，虽然核分裂与胞质分裂通常相继发生，但它们属于两个分离的过程。如大多数昆虫卵，核可进行多次分裂但无胞质分裂，从而形成多核原生质团。

与动物细胞相比，高等植物细胞分裂表现出自身的特点。如植物细胞不含中心体，但在细胞分裂时仍可进行纺锤体装配。此外，高等植物胞质分裂机制不同于动物细胞，这可能与植物细胞存在坚硬的细胞壁有关。两个子细胞的最终分开不是由于细胞表面缢缩环的作用，而是由细胞内形成一个新的细胞壁代替。具体过程如下：末期开始时，在两套分离的染色体中间新的细胞壁在细胞质中开始组装，在组装过程中，通过一个被称为“成膜体”(phragmoplast)的结构发挥重要的作用。现认为该结构是由原有的有丝分裂纺锤体赤道板处残余的极微管形成，一些小的被膜包围的囊泡及从高尔基器装置衍生而来的较大囊泡(内含有细胞壁基质所需的多聚糖类和糖蛋白)均沿着微管被转运至成膜体的赤道处，在该处互相融合形成一个圆盘状膜包围结构；并且，该结构通过囊泡进一步融合延伸向外扩展，直至它到达细胞质膜和原初细胞壁，质膜和围绕新细胞壁的膜融合，将细胞分裂为二，形成两个子细胞。在此过程中，在基质中存在的纤维素等也参与完成新的细胞壁的构建(图 8－17)。

综合上述，在正常情况下，高等真核生物有丝分裂要经历上述顺序发生的过程，但在自

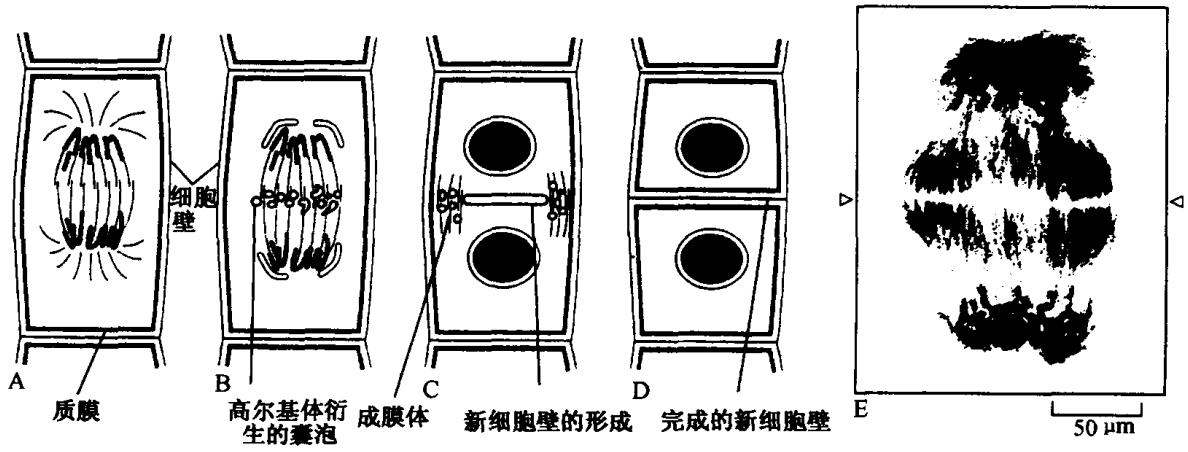


图 8－17 植物细胞胞质分裂示意图

A. 末期开始时，染色体已分离；B. 一个新的细胞壁在细胞内纺锤体的赤道板上开始组装；C. 有丝分裂纺锤体在末期残余的极微管构成“成膜体”和指导囊泡排列到纺锤体的中央。在该处从高尔基器衍生而来的膜包围的囊泡融合，构成不断生长的新的细胞壁；D. 上述结构不断向外扩展到达细胞质膜和原初细胞壁。质膜和围绕新细胞壁的膜融合，形成两个子细胞；E. 一个处于末期的植物细胞光学显微镜照片，相当于前述(B)阶段，图示两套子染色体和微管，箭头所指为生长的新细胞壁的定位处(引自 B. Alberts, 1998)

然界也会发生不同类型的有丝分裂变异现象。常见的有胞质不分裂形成双核或多核，后期染色体不分开或进行核内有丝分裂形成多倍体，缺少 M 期与形成多线染色体、多极分裂形成多核细胞等。

8.5 减数分裂

减数分裂(meiosis)是细胞有丝分裂的一种特殊形式，它是随配子生殖而出现的。凡是进行有性生殖的动、植物都进行减数分裂。减数分裂与有丝分裂的不同点在于减数分裂时，连续进行两次核分裂，其中染色体 DNA 只复制一次，结果染色体的数目减少一半，染色体数由 $2n$ 减到 n。一般在配子形成过程或在配子形成前进行减数分裂，因此配子具单倍染色体(n)，由雌、雄配子(卵和精子)结合形成合子(受精卵)以及由其通过有丝分裂所形成的体细胞则具有双倍染色体($2n$)。这样不仅保持了物种遗传性的稳定，且又能增加新的变异，因为在减数分裂过程中，染色体发生复杂的变化，如同源染色体相互识别配对、交叉、重组、分离等，这对生物的遗传变异、物种进化、增强对环境的适应能力等都有重要意义。

每种生物减数分裂发生的时间是比较恒定的。在不同生物类群之间则有很大差异。根据减数分裂在生物生活史中发生时间的不同，大致可分为 3 种类型。

8.5.1 减数分裂的 3 种类型

1. 配子减数分裂(gametic meiosis)或称终端减数分裂(terminal meiosis)：它存在于一般动物，包括所有后生动物和很多原生动物以及少数低等植物如硅藻。这种类型的减数分裂发生在配子形成过程中的最后二次分裂(图 8－18 左)。因此这种类型的减数分裂即为卵子发生(oogenesis)和精子发生(spermatogenesis)过程的一部分。

2. 合子减数分裂(zygotic meiosis)或称始端减数分裂(initial meiosis)：这种减数分裂与配子减数分裂的时间恰恰相反，它是在配子融合成合子后发生，而不是在配子融合以前发生。即由合子开始的最初的两次分裂为减数分裂，它正处在有性生活史的开始。因此合子是二倍体。由合子减数分裂后形成单倍的配子体，由配子体产生配子(图 8－18 右)。它仅存在于一些原生生物和真菌，很少数的藻类如水绵(*Spirogyra*)、某些硅藻、海索面(*Nemalion*)等。有一些理由推测这是一种很原始的减数分裂。

3. 孢子减数分裂(sporic meiosis)或称中间减数分裂(intermediate meiosis)：它存在于所有高等植物和一些藻类，发生在合子和配子形成之间，由孢子体($2n$)产生减数分裂。减数分裂的产物不是配子，而是无性的孢子(图 8－18 中)。因此这种减数分裂是孢子发生(sporogenesis)的一部分，经减数分裂产生的孢子是单倍数的染色体，孢子发育成为单倍体的有性世代——配子体(gametophyte)(在种子植物雌配子体为胚囊，雄配子体为花粉)。配子体通过正常的有丝分裂产生配子，雌雄配子结合形成二倍体的合子，由合子发育成为二倍体的无性世代——孢子体(sporophyte)，由孢子体经减数分裂产生孢子。

8.5.2 减数分裂过程及各期特征

在不同类群生物的生活史中，进行减数分裂的时间不同。但是减数分裂的具体过程及其内容在各种生物基本是一致的。多细胞动物减数分裂是在配子(精子、卵)发生过程中进

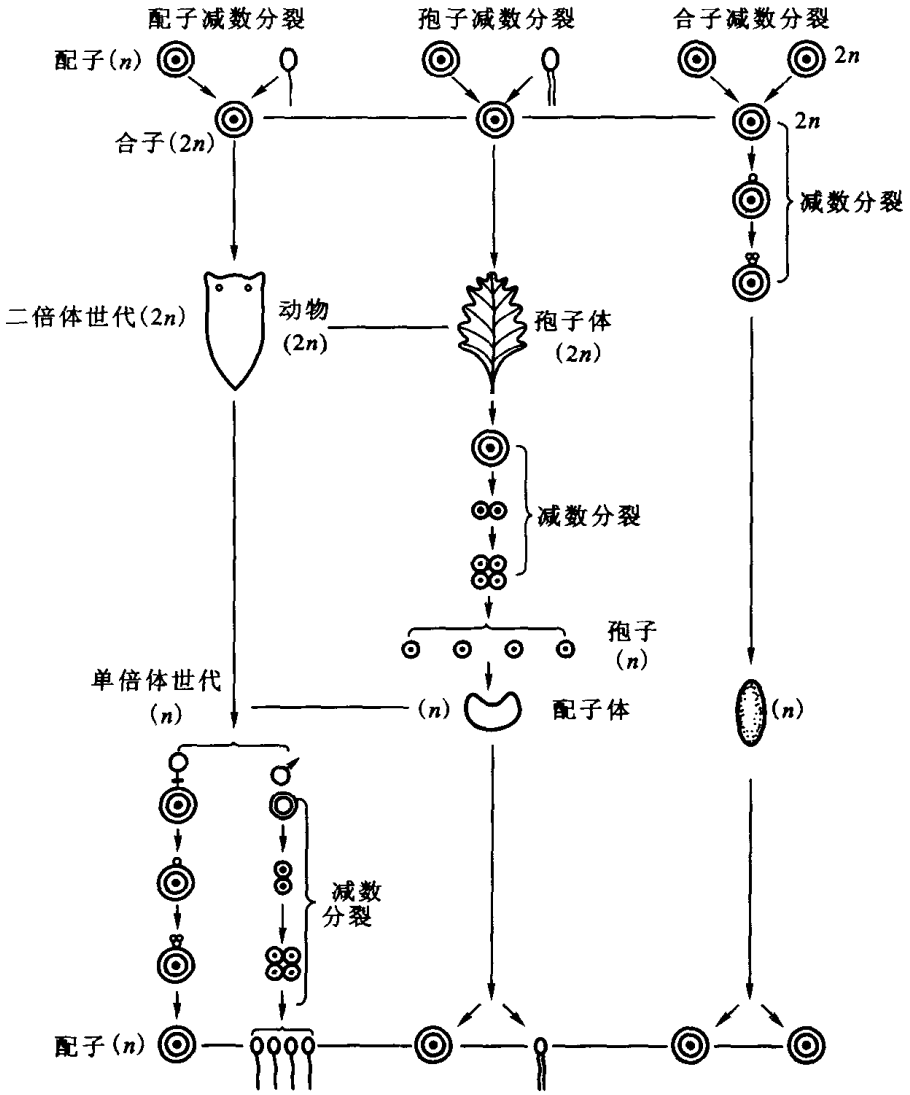


图 8-18 减数分裂 3 种类型比较图解
(仿 E.B. Wilson)

行的(图 8-19)。在性细胞成熟期进行减数分裂,开始于初级精母细胞(primary spermatocyte)或初级卵母细胞(primary oocyte),因此精母细胞和卵母细胞常被称为性母细胞(meiocyte)。在细胞进入减数分裂之前的细胞间期,特称为减数分裂前间期(premeiotic interphase),其最大特点是 S 期持续时间较长,一般比有丝分裂前的 S 期时间长若干倍。大多数减数分裂前间期的细胞核大于其体细胞核,染色质也多凝集成异染色质。经过减数分裂前间期,细胞进入减数分裂。减数分裂包括两次连续的分裂过程:第一次减数分裂和第二次减数分裂。第一次减数分裂分为前期Ⅰ、中期Ⅰ、后期Ⅰ、末期Ⅰ;第二次减数分裂分为前期Ⅱ、中期Ⅱ、后期Ⅱ、末期Ⅱ(图 8-20)。两次分裂之间的间期长短不一,但 DNA 不复制。

1. 第一次减数分裂

(1)前期Ⅰ:在此期中染色体发生一系列复杂的变化,根据其变化的形态特征,可将前期分为细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期(图 8-20A~E)。前期持续时间很长,占整个减数分裂的 90%以上,有的达几周、几个月,甚至几年、几十年之久。

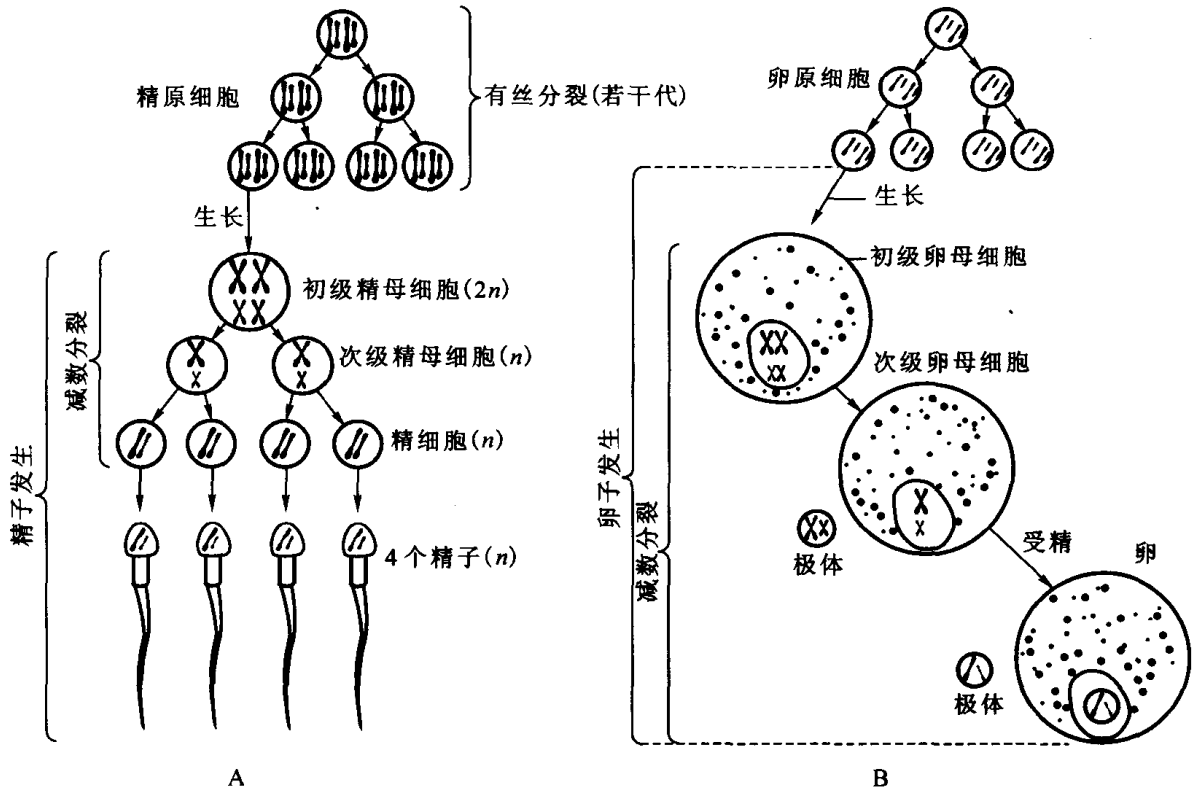


图 8－19　脊椎动物精子和卵发生过程图解：比较精子和卵的形成(引自 G.Karp)

细线期(leptotene stage)或称凝集期(condensation stage)：染色体呈细线状盘绕在核内(图 8－20A)。此时染色体已复制，但在光镜下，看不见两条姊妹染色单体，只可见一条细线状染色体。在电镜下显示出它由两条姊妹染色单体构成。染色体的两端端粒通过接触斑与核膜相连。染色体上有许多呈粒状结构的染色粒(chromomere)。有人认为它相当于 G 带的深染带。

偶线期(zygotene stage)，也称配对期(pairing stage)：主要特点是来自父母双方的同源染色体(homologous chromosome)进行配对(图 8－20B)，配对的过程仅发生在同源染色体之间，非同源染色体不能进行配对。配对后两同源染色体结合在一起的结构称为二价体(bivalent)。由于每个二价体为 2 条同源染色体组成，共有 4 条染色体单体，因此又称为四分体(tetrad)。同源染色体配对的过程称为联会(synapsis)。联会开始，一般同源染色体端粒与核膜相连的接触斑互相靠近结合，从端粒处开始向染色体其他部位延伸直到两同源染色体侧面紧密联会。也有沿染色体长轴由一点或多点同时开始进行联会。已有实验表明，许多物种的染色体上存在大量的配对位点，而且某个位点的配对会促进染色体其他区段的配对。蠕虫的每个染色体上都有一个单独的、能促进整个染色体联会不可缺少的位点，称为同源染色体识别区(homologous recognition region，HRR)，常位于染色体的一端，是一个易被接近的 DNA 区域。端粒在染色体配对联会中起重要作用。在联会的部位形成一种特殊的结构，称为联会复合体(synaptonemal complex，SC)，沿同源染色体纵轴分布，光镜下可见为 0.15～0.2 μm 极细的缝隙，电镜下显示其具有中央组分(central element)和侧生组分

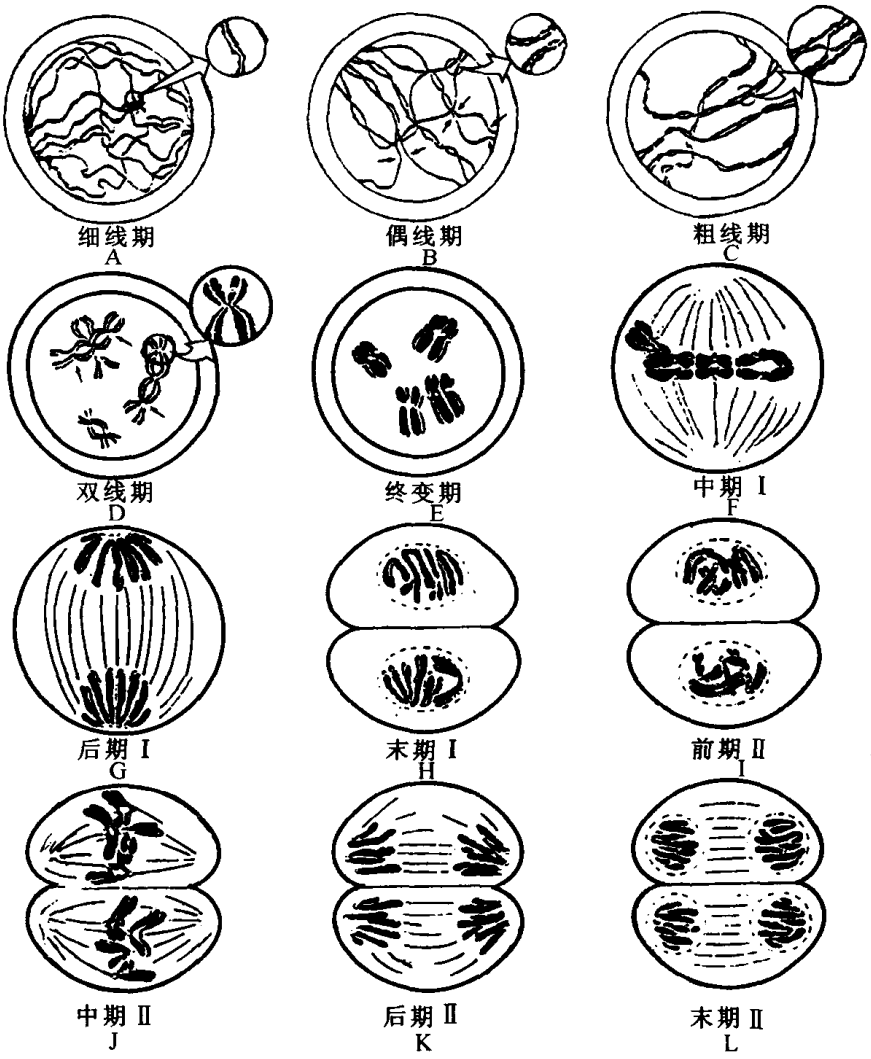


图 8－20 减数分裂过程图解(仿 S. L. Wolfe)

(lateral element)的复杂结构(图 8－21)。多年来认为 SC 与基因重组有关,现在看,SC 不直接参与重组,而是为重组事件提供所需的支架结构(图 8－22)。

近来在植物百合中发现,其减数分裂前的 S 期,DNA 总量未完全复制,余下0.1%～0.3%DNA 在偶线期复制,这些推迟复制的 DNA 在整个基因组中被分割为 5 000～10 000 个小片段,每个小片段长约 1 000～5 000 bp,这在偶线期合成的 DNA 称为 zygDNA,由其转录的 RNA 称为 zygRNA,zygDNA 转录可能与染色体配对联会有关。

联会是令人感兴趣的事件。有一些难回答的问题:在什么基础上同源染色体彼此识别?染色体对如何能那么精确地排列定位?什么时候在同源染色体间首先发生识别?几年来已假定同源染色体之间的相互作用开始于联会。最近根据 Nancy Kleckner 等对酵母细胞的研究表明,同源染色体 DNA 的同源区域在细线期时已彼此接触,在偶线期时染色体靠近结合联会成为光镜下可见的结构。目前对于减数分裂分子方面的认识,仍处于比较模糊的阶段,尚需进一步深入研究。

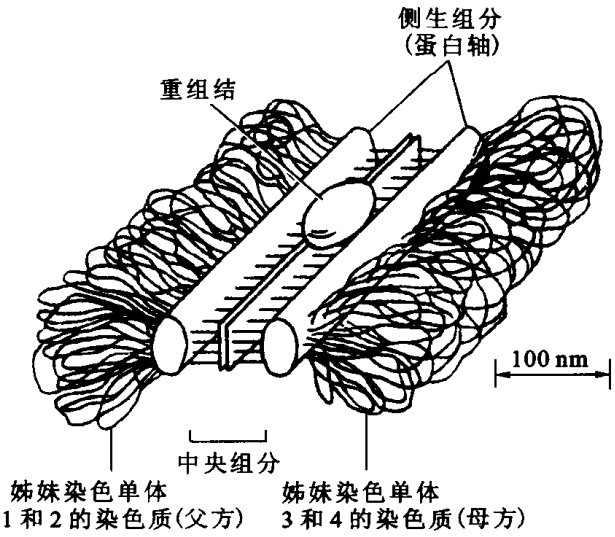


图 8－21　SC 结构图解

示两侧生组分(各约 20～40 nm 宽)和中央组分(约 30 nm 宽),在侧生组分和中央组分之间有许多横向排列的纤维(60～70 nm)连接使 SC 呈梯形。SC 主要由蛋白质、RNA 组成,含少量 DNA。现已克隆出几种编码 SC 的横向纤维的基因。对 SC 的侧生组分分析,发现其中减数分裂特异蛋白在成熟的 SC 侧生组分中对减数分裂中同源染色体分离起作用。拓扑异构酶Ⅱ也位于侧生组分上。在 SC 上有重组结(仿 B. Alberts, 等)

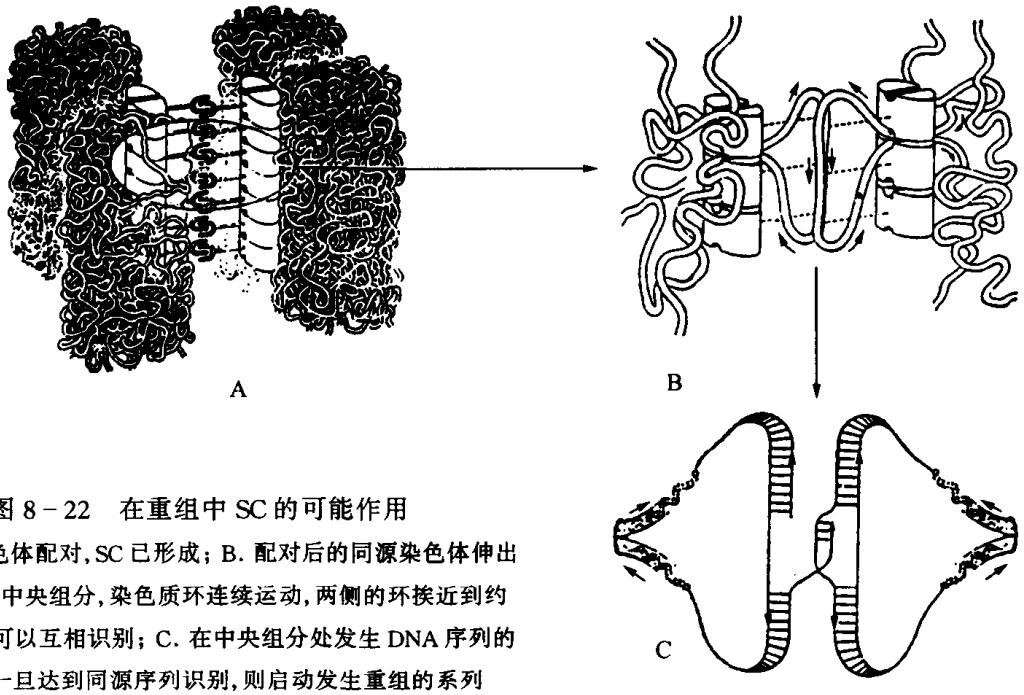


图 8－22　在重组中 SC 的可能作用

A. 同源染色体配对,SC 已形成; B. 配对后的同源染色体伸出染色质环到中央组分,染色质环连续运动,两侧的环挨近到约 1 nm,分子可以互相识别; C. 在中央组分处发生 DNA 序列的连续比较,一旦达到同源序列识别,则启动发生重组的系列活动(引自 S. L. Wolfe)

粗线期(pachytene stage),也称重组期(recombination stage):开始于同源染色体配对完成之后,染色体明显变粗变短,且同源染色体紧密配对,一直与核膜相连(图 8－20C)。在 SC 的梯形结构中间出现重组结(recombination nodule)(图 8－21),多为球形、椭圆形,很像在两同源染色体之间的梯子上放的大球,其直径约 90 nm,内含蛋白质,是一种含有多种酶的"重组机器",横过 100 nm 的 SC 宽度,将父母双方的染色单体局部区域的 DNA 结合在一起(图 8－22),通过它发生活跃的重组过程。虽然,目前对重组结的结构和活动机制尚了解不够,但已有许多间接证据表明它可介导染色单体的互换。如电镜放射自显影显示,标有放射活性的 DNA 前体优先掺入到靠近或在重组结的粗线期 DNA;在染色体上重组结的整个数目约等于交叉(详见双线期)的数目,它沿着 SC 的分布方式也与互换相同,在异染色质与 SC 结合的那些区域缺乏重组结;有的果蝇突变引起互换不正常的分布,重组频率降低,发现

这些突变体具相当少的重组结并改变了分布,与互换的分布一致。这种相关表明,重组结决定每个互换的位点。在互换位点上有 DNA 合成,主要用于 DNA 链修补、连接。在此期中还有的物种合成超量的 rDNA,转录成更多的 rRNA 形成附加的核仁;合成一些减数分裂特异的组蛋白,可能用于重组机制。粗线期持续时间较长,可经几天、几月或更长。

在粗线期,同源染色体间可发生局部互换,从而产生遗传重组,但在光镜下不易看到,到双线期出现了交叉现象才易于辨别。

双线期(diplotene stage),也称合成期(synthesis stage):这一时期的主要特点是交叉(chiasma)现象明显可见。此时组成二价体的两条同源染色体表现相斥而分离,但由于同源染色体之间的互换尚未完成,因此,在不同的二价体上分别在不同部位,不同程度地呈现相互连接的交叉现象。交叉的数目一般与染色体的长度成比例。由于交叉作用,二价染色体的形状有很大变化,如只有一个交叉时染色体常呈"X"形,有几个交叉,则呈链环形。这时期可清楚看到四分体(图 8-20D、8-23)。双线期继续进行,交叉点逐渐移向染色体两端,这种现象称为交叉端化(terminalization)。许多种动物卵母细胞双线期的染色体形成灯刷染色体,从染色体上伸出许多侧环(见 7.3.5.2 灯刷染色体),mRNA、rRNA 合成活跃,核仁明显增大、增多,有的可达上千个。双线期持续时间很长,两栖类卵母细胞此期可达一年,人胚胎卵巢中的卵母细胞 5 个月能达到这一时期,出生后经儿童期、性成熟,直到排卵之前,此期可维持 50 年之久,每月有一枚卵成熟,才进入减数分裂的下一阶段。

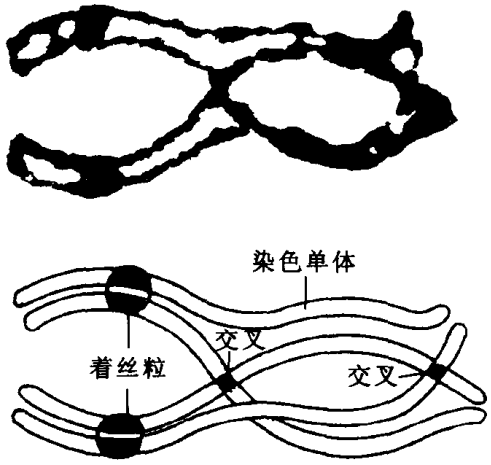


图 8-23 蝾螈精母细胞双线期一个 2 价体照片(上)及其图解(下)
示 4 条染色单体,2 个交叉,2 个姊妹着丝粒并排存在(引自 De Robertis)

终变期(diakinesis stage),也称为再凝集期(recondensation stage):双线期结束染色体又变成紧密浓集状态(图 8-20E),端化明显,继续完成端化,染色体较均匀地分布核内,最后核仁消失,核被膜解体,标志终变期结束,开始进入中期。终变期完成即减数分裂前期Ⅰ结束。在此期中发生了染色体重组,合成了为配子或胚胎早期发育所需要的全部或大部分 RNA 和蛋白质等。

(2)中期Ⅰ:随着核被膜解体、消失,细胞进入前中期,染色体进一步排列在细胞的赤道面上,纺锤体达到最大程度,即达到了中期(图 8-20F)。这与有丝分裂的中期相同。不同点是减数分裂中期Ⅰ的染色体为二价体,构成二价体的两同源染色体,其姊妹染色单体的动粒融合。这样,每个二价体的两个动粒分别在赤道面的两侧,各自面向相对的两极(图 8-24)。由此决定了每对同源染色体分向两极的去向。此时姊妹染色单体臂紧密贴近,同源染色体上的交叉仍结合在一起,染色体最为浓缩,也是鉴别染色体的适宜时机。

(3)后期Ⅰ:二价体的两同源染色体分离并分别向两极移动(图 8-20G)。每条染色体的二条姊妹染色单体共有一个着丝粒和一个动粒(或者说其动粒是一个功能单位),一般短的二价体常有一个端部交叉相连,同源染色体分离快,如为长的二价体,有未完全端化的交叉则分离较晚,因此从侧面观后期Ⅰ染色体呈现不同形状。此时的同源染色体,由于交叉、

互换、重组，在染色单体上都有不同程度的父母双方互混的成分。

偶而发生不正常的减数分裂，有的同源染色体未分开，称为不分离(nondisjunction)现象，这样所产生的单倍体细胞缺一个染色体，另一个细胞则多一个染色体，这种配子形成不正常的胚胎，大部分死亡，也有幸存者。例如人的 Down's 综合症是由 21 号染色体多一个拷贝引起的。由于在减数分裂时 21 号染色体未正常分离，产生的配子含有 2 个拷贝的 21 号染色体，这种不正常配子与正常的配子结合后，导致胚胎细胞具有 3 个拷贝的 21 号染色体。

(4)末期Ⅰ：当染色体到达两极，即开始进入末期(图 8－20H)。染色体去凝集，核被膜、核仁出现，胞质分裂，形成两个子细胞，分别含有每对同源染色体中的一条染色体，结果染色体数目减半。在动物就形成了两个次级精母细胞或次级卵母细胞。

末期Ⅰ之后，经过很短的间期，但 DNA 不复制，有些种类不经过间期(或短暂的停留)，染色体不去凝集，即进入了第二次减数分裂。

2．第二次减数分裂

与有丝分裂过程基本相同，也分为前、中、后、末各期(图 8－20I～L)。前期Ⅱ历时很短，染色体呈线状，随着纺锤体出现，核被膜破裂，其后中期Ⅱ、后期Ⅱ和末期Ⅱ通常很快相继进行，与有丝分裂不同的是每个染色体只有 1 个拷贝，而不是 2 个同源的。在末期Ⅱ，核被膜形成围绕 4 个单倍体的核，形成 4 个单倍体细胞(图 8－19A)，至此完成了减数分裂的全过程。

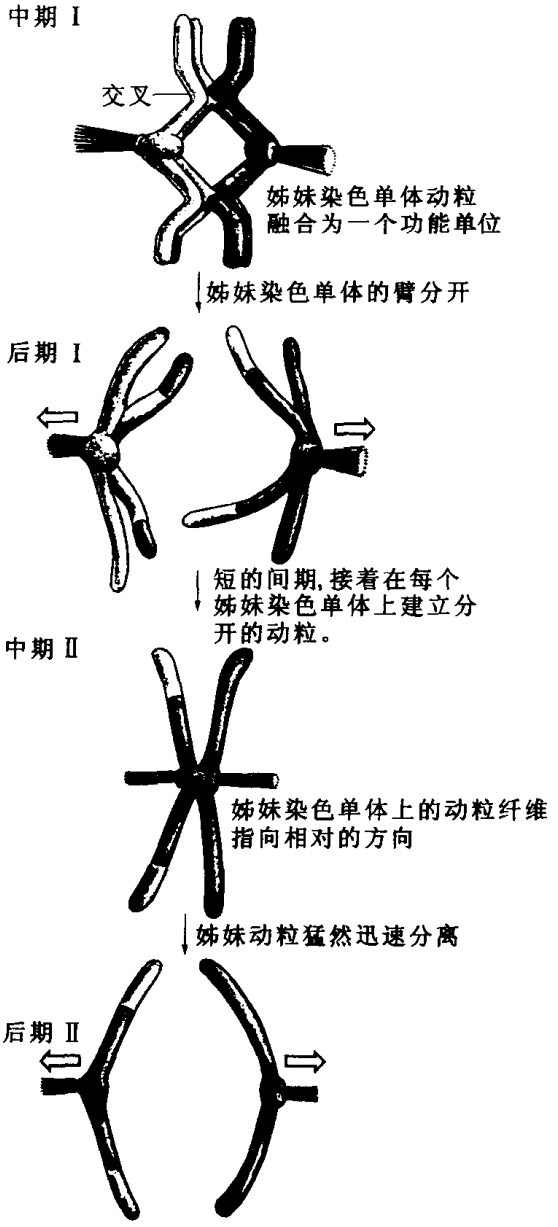


图 8－24　减数分裂Ⅰ染色体排列(中期Ⅰ)和分离(后期Ⅰ)与减数分裂Ⅱ的比较

性细胞形成过程中，每个性母细胞经过减数分裂产生 4 个子细胞，子细胞内染色体的数目比性母细胞减少一半。在植物中，这 4 个子细胞通称为四分孢子(tetraspore)，它们再经过一系列的生长和分化，形成配子体和配子；在动物中，雄性动物这 4 个子细胞可称为精细胞，由精细胞进一步分化形成有功能的 4 个精子，雌性动物减数分裂后所形成的配子，由于胞质不均匀分裂，在细胞一侧形成胞质极少的小细胞，无功能，称为极体(polar body)，胞质集中于一个大的卵细胞中，发育成为有功能的卵(图 8－19B)。在卵细胞中含单倍染色体组，只有一个 X 性染色体(性母细胞 $2n$ 含 XX 性染色体)；雄性性母细胞 $2n$ 染色体组中含 XY 性染色体，经减数分裂后所形成的 4 个精子，2 个含 X、2 个含 Y 性染色体。含 Y 的精子与卵结合则产生雄性胚胎，含 X 的精子与卵结合，则产生雌性胚胎。

根据对性别决定机制的了解，人们已将其应用于性别鉴定和性别控制方面。如在临床上通过染色体鉴定胎儿的性别。对家养动物的性别控制，利用 XY 两种精子理化性质的差异，将它们分开(如用沉降法或电泳法)，然后分别给雌体授精，以获得所需要的雌性或雄性动物。

减数分裂是有性生殖物种染色体数目保持恒定的机制，也是生物遗传基础发生变异的一种机制。因此它对生物的遗传、进化以至对环境适应都有重要意义。通过减数分裂，配子染色体数目减少一半，经过受精形成合子，随之发育成子代又恢复了亲代染色体的数目，从而使不同物种的染色体数目和遗传性状保持相对稳定，而且在减数分裂过程中由于同源染色体联会、交叉，同源的非姊妹染色单体互换，加强了遗传重组分配。一个个体原则上能产生 2^n 个遗传上不同的配子；"n"是单倍染色体数目。例如，人类每个个体能产生至少 $2^{23} = 8.4 \times 10^6$ 遗传上不同的配子，加上染色体基因互换、重组，实际变异的数目远远大于这个数值，而且形成了极为庞大数目、不同染色体组成的配子，所以除了由一个受精卵发育的孪生子外，没有遗传上完全相同的子代，可见变异性增强了。生物的进化需要可遗传的变异不断地产生，无疑，变异的增加有益于进化，也增强了物种对环境的适应。

8.6 细胞增殖调控因素

在细胞增殖过程中，细胞内出现了一系列结构功能的变化。细胞增殖是多阶段、多因子参与的精确、有序的调节过程，增殖调控的紊乱引起细胞增殖、分化异常，发生癌变，甚至死亡。关于细胞增殖调控的研究，综观看来，当前研究的热点主要有下列领域：一个是研究与细胞增殖相关基因及其产物在细胞增殖调控中的作用，如细胞周期引擎分子、周期蛋白和 Cdk 激酶、癌基因与抑癌基因等；另一个是研究细胞增殖调控的信号转导(signal transduction)机制，即当外界信号(如生长因子等)作用于细胞时，通过与膜上相关受体作用后，最终引起增殖生理效应的信使传递过程等。

8.6.1 细胞周期引擎分子 Cdk 激酶和周期蛋白及相关周期调节蛋白与细胞增殖调控

正如前述，细胞增殖是通过细胞周期实现的。长期以来细胞生物学家、分子生物学家和遗传学家们运用不同材料对细胞周期从 G_1 至 M 等各个周期和周期的过渡等问题进行了研究，在诸多的调控研究中，Cdk 激酶和周期蛋白(cyclin)的研究最为令人注目，这是细胞周期调控系统中两个关键组分，也是近年来细胞生物学发展迅速的领域之一。

8.6.1.1 Cdk 激酶和周期蛋白在细胞周期进程中的调控作用及其活性调节

1. MPF 的发现及其组成与作用

有关 Cdk 激酶与周期蛋白的研究，最早来源于细胞进入 M 期有关 MPF 的研究。早在 20 世纪 70 年代初，Johnson 和 Rao 将 M 期与间期 HeLa 细胞进行融合，可引起间期核染色质凝集，此种现象称为早熟染色体凝集(premature chromosome condensation, PCC)。PCC 形态学可反映出间期细胞融合时所处的细胞周期的位置，同时该实验也提示了在 M 期细胞中可能存在一种诱导染色质凝集的因子存在。Masui 等用孕酮处理未成熟非洲爪蟾卵母细胞诱导其成熟后，将其胞质显微注入于另一个未成熟卵母细胞中，可诱导其成熟，发生减数分

裂,作者将此种活性因子称为成熟促进因子或 M 期促进因子(M phase promoting factor, MPF)进一步实验表明,MPF 活性几乎普遍存在于从酵母到人体所有真核细胞分裂期的细胞中。MPF 在进化上具有高度保守性,有关 MPF 的分子特性引起了众多科学家们的关注与研究。

在探讨细胞周期调节的分子机理方面,20 世纪 70 年代初,在低等真核细胞酵母遗传学的研究中,建立了多种酵母细胞分裂周期温度敏感突变株和分离了不少的 *cdc*(cell division cycle)基因。正如前述,裂殖酵母中的 *cdc*2 基因和芽殖酵母中的 *cdc*28 基因最为令人注目。这两种序列高度同源(同源性可达 69% 左右)的基因作用于细胞从 G_1/S 与 G_2/M 的转移,它们都编码一种相对分子质量约 3.4×10^4 的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它们的功能可以互换。20 世纪 80 年代末,通过基因工程技术已从人 cDNA 文库中分离出人 *cdc*2 基因,其编码产物也是一个相对分子质量为 3.4×10^4、具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的酶蛋白。在 20 世纪 80 年代初,一些科学家在研究海洋无脊椎动物海胆等胚胎发育早期卵裂蛋白的合成中,发现了细胞周期调控的另一个重要调控因子——周期蛋白。实验表明,在卵裂过程中,有一种蛋白水平随细胞周期剧烈振荡,进行周期性合成与降解:间期开始合成,G_2/M 时达高峰,M 期结束后突然下降,下一轮间期又重新合成积累,再下降,如此反复进行,因此被命名为周期蛋白。进一步研究表明,该蛋白之合成与细胞进入 M 期及 MPF 活性密切相关(图 8-25)。当将海蛤(sea clam) M 期周期蛋白 mRNA 注射入未成熟蛙卵时,可诱导它们进入减数分裂 M 期。体外非洲爪蟾卵提取液实验中,在一定条件下,将 M 期周期蛋白 B mRNA 加入,可驱使细胞进入 M 期,同时 MPF 也被活化。综合上述,显示出 M 期周期蛋白在 G_2 期至 M 期的转换中起着重要的调控作用,并且与 MPF 间存在密切关系。1988 年 Lohka 等将 MPF 进行了高度纯化后表明 MPF 由 3.2×10^4 和 4.5×10^4 二种蛋白组成,通过免疫印迹,免疫沉淀和分子测序等技术检测证实了 MPF 中的 3.2×10^4 蛋白是 *cdc*2 基因的产物,MPF 中的 4.5×10^4 蛋白即周期蛋白。因此,MPF 是 $P34^{cdc2}$和周期蛋白 B 的复合物,其中 $P34^{cdc2}$是催化亚基,具有 Ser/Thr 激酶活性,周期蛋白 B 是调节亚基,具有激活 $P34^{cdc2}$活性等功能。当周期蛋白 B 和 $P34^{cdc2}$结合并经进一步活化形成活化的 MPF 后(详见后文),细胞才能从 G_2 期进入 M 期,其作用机理与 MPF 磷酸化很多涉及 M 期启动有关的蛋白质有关。这些蛋白质的磷酸化可作用于染色质凝集,细胞核被膜崩解等事件。如 MPF 可催化组蛋白 H1 磷酸化,从而调节染色体高级组装,引起染色质凝集与启动有丝分裂;MPF 可磷酸化核纤层蛋白,促使核纤层结构解体(图 8-15)。实验表明,MPF 磷酸化微管结合蛋白,影响了细胞周期纺锤体微管的动力学变化,从而作用于纺锤体组装及染色单体分离等一系列有丝分裂事件的正常进行。已有研究证实,被 MPF 磷酸化的核仁素(nucleolin)与 M 期核仁分解和染色质凝集密切有关;此外,它使一些原癌基因产物磷酸化如 c-Myc 等,从而降低这些蛋白与 DNA 结合的能力,有利于染色质的凝集等。

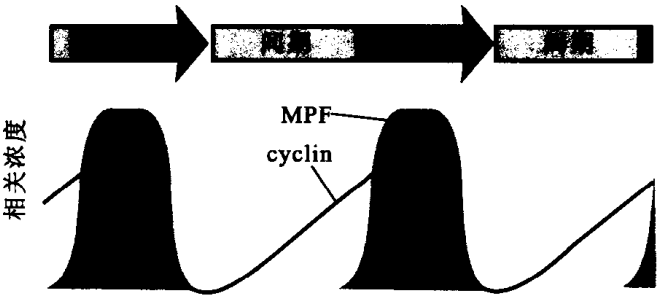


图 8-25 早期胚胎细胞周期过程中 MPF 和周期蛋白水平变化示意图

MPF:成熟促进因子; cyclin:周期蛋白(引自 B. Alberts, 1994)

2.Cdk 激酶与周期蛋白在细胞周期进程中的作用

经研究证实，Cdk 激酶是个家族，其成员有 Cdk1(即 Cdc2)、Cdk2、Cdk3、Cdk4、Cdk5、Cdk6、Cdk7、Cdk8、Cdk9 等，现认为 Cdk 家族蛋白含有一段类似的 Cdk 激酶结构域(Cdk kinase domain)，在该结构域中有一段保守序列，即 PSTAIRE 区域，该序列可与周期蛋白框结合。该家族蛋白的其他一些氨基酸残基可进行磷酸化，与调节该酶蛋白的活性密切相关。

自 20 世纪 80 年代初发现 M 期周期蛋白后，通过进一步研究表明，周期蛋白也是个家族，如在酵母中有 Cln1、Cln2、Cln3、Clb1～Clb6 等，在高等真核生物中有周期蛋白 A、B、C、D、E、F、G、H、T 等。各个周期蛋白间具有一些共同的分子结构特点，如它们含有一段相当保守的氨基酸序列(约 100 个氨基酸)，称为周期蛋白框(cyclin box)，该框介导周期蛋白与 Cdk 激酶结合。周期蛋白家族中不同成员在细胞周期时相表达不同，其结构上也具有不同特性，如 M 期周期蛋白(cyclin B、cyclin A 等)N 端结构域包含一个保守的 9 个氨基酸序列(RXXLGXIXN)的破坏框(destruction box，D－box)，它为周期蛋白泛素化和降解所必需。在 G_1 期周期蛋白(cyclin D、cyclin E 等)不含有破坏框，但其 C 端含有一段特殊的 PEST 序列，该序列可能对 G_1 期周期蛋白的降解起促进作用。周期蛋白与 Cdk 激酶结合，它们形成异源二聚体，在细胞周期进程的调控中发挥重要作用。实验表明，每种 Cdk 结合不同类型的周期蛋白，调节细胞从 G_1→S→G_2→M 期和退出 M 期进入下一个周期的进程及其他生理功能(表 8－2)。从表可见，周期蛋白 D、E、C 分别与 Cdk4/Cdk6、Cdk2、Cdk8 结合，作用于

表 8－2 哺乳动物中的周期蛋白家族和 Cdk 激酶家族

周期蛋白	调节的细胞周期时相	蛋白功能	活性的调节
A	S 期起始与进行，G_2/M	活化 Cdk2	转录水平调节与泛素降解
B_1	G_2/M	活化 Cdk1	转录水平调节与泛素降解
B_2	G_2/M	?	泛素降解
C	G_1	活化 Cdk8	?
D_1	G_1	活化 Cdk4/Cdk6	转录水平和 PEST 触发的蛋白水解
D_2			
D_3			
E	G_1/S	活化 Cdk2	转录水平和 PEST 触发的蛋白水解
F	G_2 或 G_2/M	类似 Cdk4 的泛素化作用?	转录水平的活化
G	广泛?	DNA 修复	?
H	广泛	活化 Cdk7	?
T		活化 Cdk9	
Cdk1(Cdc2)	G_2/M	磷酸化组蛋白 H1，核纤层蛋白	被周期蛋白 A 和 B 活化
Cdk2	G_1/S，S	磷酸化 pRb 及相关 DNA 复制装置	被周期蛋白 A 和 E 活化
Cdk3	G_1，或通过 start	调节 E2F 活性	?
Cdk4	G_1	磷酸化 pRb	被周期蛋白 D_1，D_2，D_3 活化
Cdk5	G_0?	磷酸化 tau 等脑蛋白	?
Cdk6	G_1	磷酸化 pRb	被周期蛋白 D_1，D_2，D_3 活化
Cdk7	广泛	活化 Cdks，与磷酸 RNA 聚合酶Ⅱ有关	被周期蛋白 H 活化
Cdk8	G_1?	与磷酸化 RNA 聚合酶Ⅱ有关	被周期蛋白 C 活化
Cdk9		与磷酸化 RNA 聚合酶Ⅱ有关	被周期蛋白 T 活化

(主要引自 P.L.Purl，等，1999)

G_1 期前进和 G_1/S 之转移;周期蛋白 A 与 Cdk2 结合,作用于 G_1/S 转换、S 期前进及 G_2/M 转移;周期蛋白 B 与 Cdk1(cdc2)结合,为 G_2 期进入 M 期所必需;而周期蛋白 H 与 Cdk7 结合,并在 p36 蛋白参与下所形成的复合物,通过磷酸化和活化绝大多数 Cdk 激酶在多个周期时相前进中发挥其调节作用。周期蛋白 - Cdk 激酶复合物不仅在细胞周期进程中具有调节作用,而且具有其他重要生理功能。如最近发现的周期蛋白 T - Cdk9 激酶复合物是 TAK 激酶(tak - associated kinase)的亚基成分,TAK 激酶通过磷酸化 RNA 聚合酶Ⅱ大亚基 C 端,促进一些基因(如艾滋病毒 HIV - 2 等)表达。

前已叙及,M 期周期蛋白和 Cdk1 复合物在 G_2/M 转换中的重要调节作用,而 G_1 期周期蛋白及相关的 Cdk 在 G_1/S 转换与 S 期前进中也同样具有重要的调控作用。正如前述,哺乳动物细胞中存在数种 G_1 期周期蛋白,其中较为重要的有周期蛋白 D、E 等,它们分别通过与 Cdk4/Cdk6 和 Cdk2 激酶结合形成具有激酶活性的复合物,通过使抑癌基因 Rb 产物——pRb 磷酸化,释放被结合的转录因子 E2F,导致与 S 期启动有关的基因转录,促使细胞通过 R 点,并从 G_1 期向 S 期转移。已知 E2F 与另一蛋白 DP 形成异源二聚体,发挥其转录因子的作用,当它们与 pRb 结合时,其活性是被阻抑的,只有在 pRb 被磷酸化后,才能被释放而被激活。已知一些为合成 dNTP 和 DNA 复制所必需的酶蛋白如胸腺嘧啶核苷激酶、DNA 聚合酶、二氢叶酸还原酶等基因的上游调控序列中含有 E2F 结合位点,因此当 E2F 被激活后,可使 DNA 合成中所需的多种酶蛋白的基因转录,从而允许细胞起始 DNA 合成和从 G_1 期向 S 期转移(图 8 - 26)。此外,它亦可激活 PCNA(增殖细胞核抗原)、周期蛋白 E、周期蛋白 A 等的基因转录作用,而上述周期蛋白又可通过对 Cdk 激酶的激活作用,提供了正反馈调节,从而进一步推动 G_1 期进入 S 期。已知周期蛋白 D 是个家族,其成员主要有周期蛋白 D_1、D_2、D_3 等,它们在不同细胞中表达是不同的。周期蛋白 D_1 对细胞通过 R 点是必须的,它可能是外界信号如一些生长因子作用于细胞周期的偶联者(linker)。令人注目的是,近年来研究发现周期蛋白 D_1 可能与肿瘤发生有关,在一些肿瘤细胞中(如小细胞肺癌等)发现周期蛋白 D_1 的扩增现象,有人认为它可能是癌基因的侯选者。另一个 G_1 期周期蛋白——周期蛋白 E 的作用晚于周期蛋白 D,周期蛋白 E 可与 Cdk2 等结合形成具有激酶活性的复合物与调节 G_1 期进入 S 期密切相关,其活性在 G_1/S 交界处达到最大值。实验证实,当显微注入周期蛋白 E 抗体时能抑制细胞进入 S 期。现认为通过周期蛋白 E - Cdk2 激酶磷酸化 pRb 或 pRb 家族蛋白 p107 后,将转录因子 E2F 释放,从而刺激与 DNA 合成有关的酶蛋白基因转录,导致细胞从 G_1 期向 S 期推进(图 8 - 26)。

周期蛋白家族中的另一成员周期蛋白 A 与 Cdk2 形成的复合物也作用于 S 期之起始,其作用机理与周期蛋白 E - Cdk2 激酶雷同。因此,不难看出,在哺乳动物细胞中,周期蛋白 E - Cdk2 激酶或周期蛋白 A - Cdk2 激酶的复合物表现出具有 SPF 的作用,在 S 期启动中发挥重要的作用。与周期蛋白 E 作用有所不同的是,周期蛋白 A 和 Cdk2 复合物的作用不仅与 S 期启动有关,而且贯穿于整个 S 期,通过作用于类似的靶物,保证 S 期的延续与进行。另一个 G_1 期周期蛋白即周期蛋白 C 的水平在早 G_1 期增加,它可活化 Cdk8,其作用可能与磷酸化 RNA 聚合酶Ⅱ有关。

3. Cdk 激酶和周期蛋白活性的调节

(1)磷酸化与去磷酸化作用

前已叙及,Cdk 表现出激酶活性,首先必须与周期蛋白结合,因此,周期蛋白的周期性合

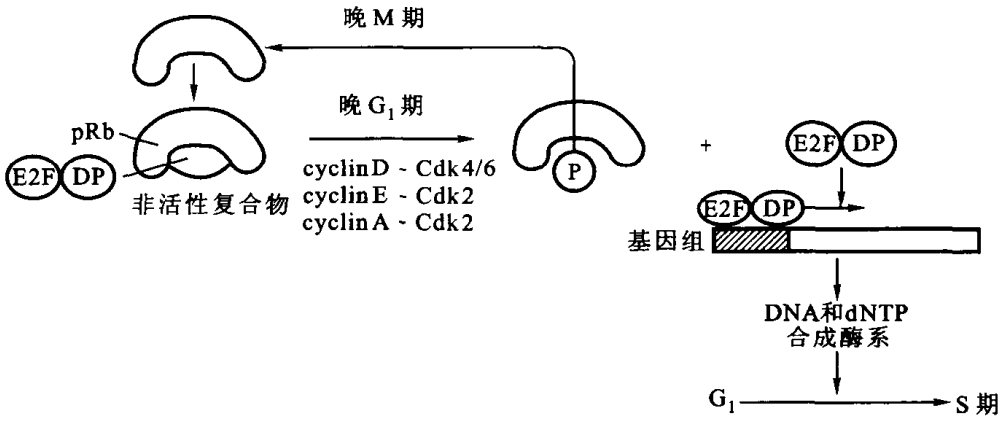


图 8－26 周期蛋白－Cdk 激酶复合物通过磷酸化 pRb，作用于 G_1→S 进程示意图

通过 Cdk 激酶活性磷酸化 pRb，释放结合的转录因子 E2F/DP，后者通过促进活化 dNTP 和 DNA 合成酶系中多种酶蛋白基因的表达，作用于 G_1→S 期过程

成和分解必然会影响该复合物的激酶活性。但是，Cdk 激酶活性除了受控于与其结合的周期蛋白的调节外，它的活性还受制于磷酸化和去磷酸化的调控。如在 G_2/M 转换过程中，Cdk1 激酶的活化状态与磷酸化和去磷酸化作用密切相关。在 Cdk1 激酶被活化过程中，首先与周期蛋白 B 结合，导致 Cdk1 构象发生变化，伴随着这种结合，Cdk1 同时进行两种磷酸化作用：一是在该蛋白 Tyr_{15}和 Thr_{14}残基上的磷酸化，负责 Tyr_{15}磷酸化的激酶是 wee I 基因的产物，而磷酸化 Thr_{14}残基则是另一类激酶；一是在该酶蛋白 Thr_{161}残基上的磷酸化，(Cdk2 是 Thr_{160}残基)，该磷酸化作用为激活 Cdk1 激酶活性所必需，由激酶 CAK(Cdk－activating kinase)完成。CAK 也是个复合物，由周期蛋白 H、Cdk7 和 p36 蛋白组成。现已知 CAK 可调节绝大多数 Cdk 激酶的活性，而且它也是通用转录因子 TF Ⅱ H 的组成成分，在 RNA 转录过程中发挥作用。CAK 通过 Cdk7Thr_{170}残基的磷酸化后被激活。在体外实验中，周期蛋白 E－Cdk2 显示出具有 CAK 激酶(CAKAK)的活性，表明在 Cdk 活性调节中可能存在的正反馈作用。在上述激酶作用下呈磷酸化状态的 Cdk1 仍处于钝化状态，通常被称为 pre－MPF，必须在磷酸酶 $p80^{cdc25}$的作用下，使 Cdk1 已被磷酸化的 Tyr_{15}和 Thr_{14}残基发生去磷酸化作用，才能使 Cdk1 最终被激活，形成活化的 MPF，通过前述的一系列作用使细胞从 G_2 期进入 M 期(图 8－27)。

研究资料表明，上述 Cdk1 被激活的程序即磷酸化与去磷酸化作用也广泛存在于其他 Cdk 家族蛋白中，并影响着与这些 Cdk 作用相关的细胞周期时相的前进。如磷酸酶 $p80^{cdc25}$不仅作用于 Cdk1 的激活，与 G_2 期进入 M 期有关，而且通过广泛作用于其他 Cdk 家族成员，也参与调节其他细胞周期时相的前进与转换。现已知哺乳类动物中至少有 3 种亚类即 Cdc25A，Cdc25B 和 Cdc25C，它们分别在不同周期中发挥作用。其中 Cdc25C 主要作用于 G_2/M 的转换，Cdc25A 主要作用于 G_1/S 过渡，Cdc25B 则分别使 Cdk1 和 Cdk2 去磷酸化后在 G_1/S 和 G_2/M 运转中均有作用。实验表明，Cdc25 在其 N 端调节区被磷酸化而被激活，它可能是 Cdk1 的靶物，被 Cdk1 磷酸化和激活。在相关的磷酸酶如蛋白磷酸酶 I(PPI)作用下使其失活。近年来，发现 $p80^{cdc25A}$和 $p80^{cdc25B}$是癌基因 c－myc 编码产物的作用靶物，c－Myc 可通过刺激 *cdc*25 基因表达发挥其在细胞增殖调控中的作用(详见 8.6 细胞增殖调控因素)。

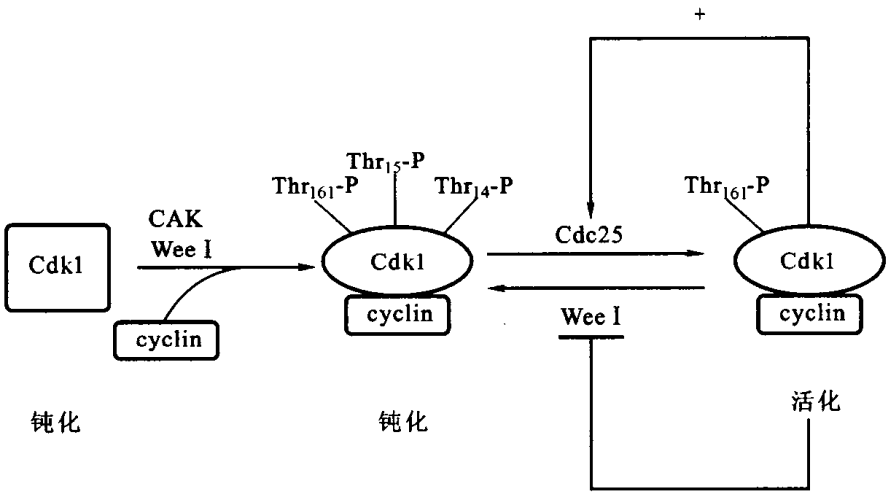


图 8－27　Cdk1($p34^{cdc2}$)被激活主要程序图

Cdk1 首先与 M 期周期蛋白结合，Wee I 等不同蛋白激酶分别使 Tyr_{15}，Thr_{14}残基磷酸化，负调 Cdk1 活性，CAK 使 Cdk1 中 Thr_{161}残基被磷酸化，为激活 Cdk 激酶所必需。$p80^{cdc25}$磷酸酶使 Tyr_{15}和 Thr_{14}去磷酸化，最终形成具有活性的蛋白激酶

(2)蛋白质水解在细胞周期运转中的作用

细胞周期的运转是个动态的、周而复始的过程，如 M 期的进入需要周期蛋白 B 的形成积累和与 Cdk1 结合及活化，但当离开 M 期进入下一个周期时则又需要周期蛋白 B 的降解等。与此类似，一些 Cdk 抑制因子 CKI 也存在一个被降解的过程，才能使相关的 Cdk 激酶表现出活性，确保细胞周期的正常运转。现已知主要通过泛素－蛋白水解酶复合物水解系统(ubiquitin－proteasome proteolytic system，UPPS)。该系统在细胞周期前进调控中起重要作用。泛素是一个约 76 个氨基酸的高度保守蛋白；蛋白水解酶复合物(proteasome)是细胞质中的蛋白质复合物，由众多亚基组成，大小约 26S，内含多种蛋白酶，负责降解连接有泛素的蛋白质。首先在泛素 C 端与泛素活化酶 E_1 形成硫酯键而被活化；然后转移给 E_2 或 UBC(ubiquitin－conjugating)，又称 Ub 转运酶；最后直接或通过泛素—蛋白连接酶 E_3 将泛素转移至目标蛋白的赖氨酸残基上。在此过程中进行多聚泛素化作用，才能被蛋白水解酶复合物识别和水解。E_3 是参与了泛素化的最后阶段，它的作用是使已负荷 E_2 的泛素与含有 D－box 的底物结合，并经过 proteasome 水解；它可能在辨认泛素化级联反应中对识别底物的特异性发挥作用。图 8－28 示 M 期周期蛋白通过泛素－蛋白水解酶复合物途径被降解的过程。

通过图示可见 M 期周期蛋白通过泛素－蛋白水解酶复合物的降解作用需 E_2 酶的参与，此外还需要一个大的功能上类似 E_3 的复合物，它在 M 中期到 M 后期被激活，该复合物被命名为 Cyclosome 或被称为后期促进复合物(anaphase－promoting complex，APC)，它是一个蛋白质复合物，其作用是使已负荷 E_2 的泛素和含有 D－box 的底物结合，并经 proteasome 水解。在芽殖酵母中，已知有 Cdc16，Cdc23，Cdc27 等蛋白。现已从非洲爪蟾中分离出 APC，它由 8 个亚基组成。值得提出的是不仅 M 期周期蛋白降解需要 APC，而且当细胞从 M 中期向 M 后期推进时，APC 的作用也是必需的。实验表明，在非洲爪蟾和芽殖酵

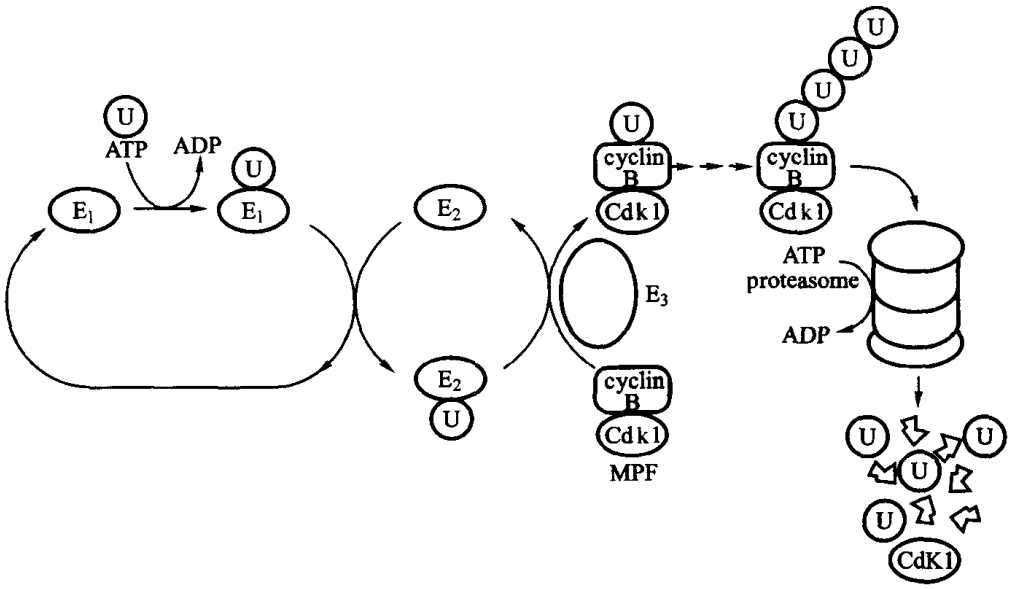


图 8-28 M 期周期蛋白(cyclin)通过泛素-蛋白水解酶复合物途径被降解示意图(详见正文)
U:泛素;E_1:泛素活化酶;E_2:泛素转运酶;E_3:泛素-蛋白连接酶;proteasome:蛋白水解酶复合物

母等生物中,MPF 失活并不能触发姊妹染色单体的分离,但该过程依赖于 APC 的作用。上述现象表明在 M 中期向后期转移时,存在一类后期抑制因子,它们不是通过抑制周期蛋白,正如前述,它们可能通过结合与抑制一些导致染色单体分离的蛋白(separins),从而阻抑了染色单体的分离,抑制了 M 中期向后期的转换,APC 可降解这些抑制因子,起始染色单体的分离。现已知芽殖酵母和裂殖酵母中分别存在可被 APC 降解的后期因抑制子如 PDS1 和 CUT2(图 8-29)。近年来发现在人和非洲爪蟾中也可能存在类似具有 PDS1 作用的后期抑制因子,它们通过 APC 通路被降解。此外,前已述及,在真核生物中存在可将染色单体连接在一起的粘连蛋白复合物(cohesin complex)如 Smc1、Smc3、Scc1 等,它们也可能通过 APC 通路被降解而作用于染色单体的分离,但具体机理尚有待进一步阐明。并且,令人注视的是,当 APC 使 M 期周期蛋白降解之同时,也导致阻抑 DNApre-RC 形成的 M 期 Cdk 活性的被抑制,从而也使得新一轮 DNA 复制成为可能。APC 活化的机理,可能与其被磷酸化有关,如 MPF 等可使其激活。此外,一种相关蛋白 Cdc20 也是 APC 的活化因子,实验表明位于动粒上的 Mad2 通过与 Cdc20 及与 APC 的结合可抑制 APC 的活性,因此,只有当解除 Mad2 对 APC 的抑制作用后,才能发挥 APC 的作用,使后期抑制因子降解,从而作用于染色单体的分离和后期的被启动。

泛素-蛋白水解酶复合物系统也作用于 G_1 向 S 期的转运。正如前述,酵母等真核细胞从 G_1 期向 S 期转移时,需要一个 Cdk 活性的抑制因子 $p40^{sic1}$ 的降解,只有这类抑制因子降解后,S 期 Cdk 激酶才能表现出活性,作用于 G_1/S 的转运。在芽殖酵母中,由 Cdc34 通路负责这类抑制因子的降解,在此通路中,Cdc34 蛋白是由 *cdc*34 基因编码的具有连接泛素特性的酶蛋白,它可使 $p40^{sic1}$ 降解。其他几类蛋白如 Cdc53、Cdc4 对于 $p40^{sic1}$ 的降解也是需要的。在此过程中,活化的 G_1 期周期蛋白-Cdk 激酶,通过磷酸化 S 期 Cdk 激酶抑制因子 $p40^{sic1}$,后者才能被 *Cdc*34 通路降解。因此,在 *Cdc*34 通路蛋白质水解过程中,活化的 G_1 期周期蛋白-Cdk 激酶是必需的。此外,G_1 期周期蛋白-Cdk 激酶的活化尚可通过抑制 APC 通路允

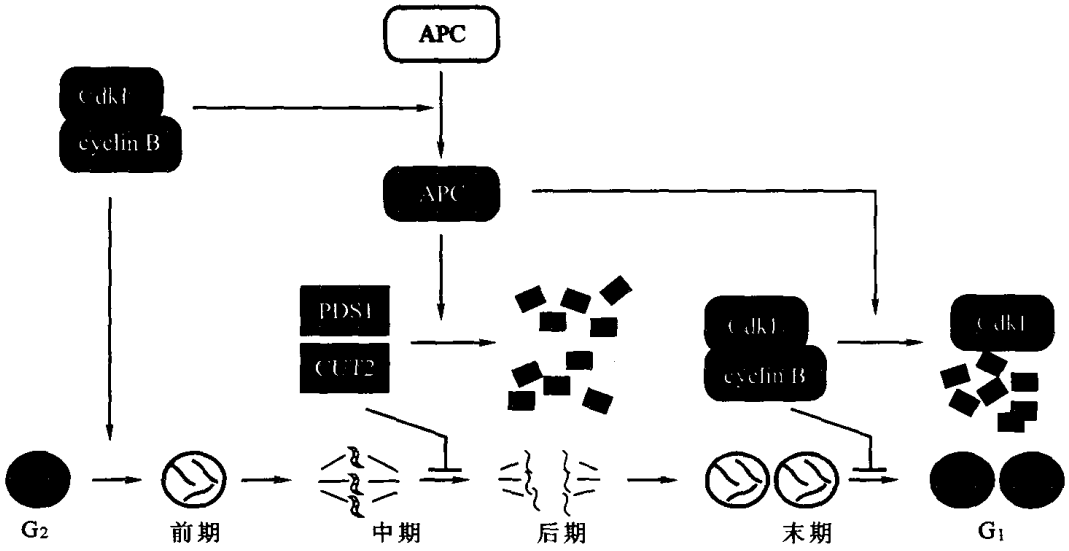


图 8－29　APC(后期促进复合物)通过对后期抑制因子和 M 期周期蛋白的降解分别促进 M 中期向后期的推进和离开 M 期示意图

APC:后期促进复合物;PDS1,CUT2:后期抑制因子(引自 R. W. King, 等, 1996)

许 M 期周期蛋白积累,使 M 期成为可能。现有资料表明,在哺乳动物细胞中存在的一些 Cdk 抑制因子如 p27 等也通过泛素－蛋白水解酶复合物系统的通路被降解,作用于细胞从 G_1 期进入 S 期。一旦 DNA 合成起始后,周期蛋白通过泛素蛋白水解酶复合物途径被降解,使细胞周期能正常运转(图 8－30)。

通过上述,可见泛素—蛋白水解酶复合物系统的活化推动了细胞周期前进并参与了细

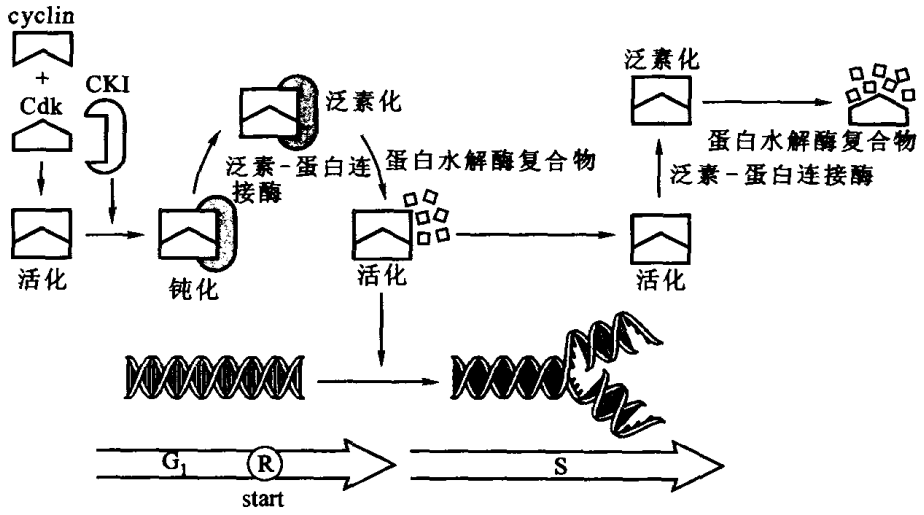


图 8－30　泛素－蛋白水解酶复合物在 DNA 复制中的调节作用和促进细胞进入 S 期示意图

Cdk 激酶抑制因子(CKI)通过泛素连接酶作用,被泛素化的 CKI 被 26S 蛋白水解酶复合物降解,周期蛋白－Cdk 激酶被活化,DNA 复制起始和细胞进入 S 期,一旦 DNA 复制起始,周期蛋白被泛素－蛋白水解酶复合物途径降解,从而使细胞周期能正常运转(引自 G. P. V. Reddy, 1999)

胞周期运转的调控。因此，不难看出，依赖于周期蛋白的 Cdk 家族蛋白的磷酸化和去磷酸化作用与泛素介导的蛋白质降解作用在细胞周期运转的调控中均具有重要作用，它们相互协调，共同操作周期运转的调节过程。

8.6.1.2 Cdk 抑制因子(Cdk inhibitors, CKIs)与细胞增殖调控

近年来利用基因工程、双杂交体系及经典的生物化学等技术，先后在真核细胞中发现了多种 CDK 激酶的抑制因子(CDK inhibitors, CKI)。CKI 的发现使人们对于细胞周期调控和检验点的作用有了更为全面、深刻的了解，在阐明细胞癌变的分子机理方面也提供了重要线索。现已知的 CKI 类蛋白如芽殖酵母中的 FAR1、Sic1 等，裂殖酵母中的 rum1 等，在哺乳动物中的 p15、p16、p18、p19、p21、p27 等，根据序列的相似性与作用特异性的特点，哺乳动物 CKI 被分为两个家族，即 CIP/KIP 家族和 INK4 家族，前者包含 $p21^{cip1}$、$p27^{kip1}$和 $p57^{kip2}$，后者包含有 $p16^{INK4a}$、$p15^{INK4b}$、$p18^{INK4c}$、$p19^{INK4d}$等(表 8－3)。在哺乳动物中，一部分编码 CKI 蛋白的基因在不少肿瘤细胞中缺少频率很高，因此被认为可能是新的抑癌基因，如 p16 等。

表 8－3 哺乳动物中主要的 Cdk 抑制因子(CKIs)及其主要特性

抑制因子	染色体定位	作用的 Cdk	调节机制	主要功能
$p21^{cip1}$	6p21	多种 Cdks 与 cyclin、Cdk 和 PCNA 形成四聚体复合物	被 p53 诱导	p53 蛋白周期调节作用的中介者，抑制 DNA 复制与细胞周期过程，参与细胞增殖分化和衰老的调节
$p27^{kip1}$	12p13	Cdk2, Cdk4 等	被接触抑制、TGFβ 上调	对生长因子 TGFβ 负调信号反应，主要阻抑 G_1/S 转移
$p57^{kip2}$	11p15.5	Cdk2, 3, 4		抑制周期蛋白 E－Cdk2 和周期蛋白 A－Cdk2 的 H1 激酶活性
$p16^{INK4a}$	9p21	Cdk4, Cdk6	被 pRb 下调	与周期蛋白 D 竞争结合 Cdk4/6，通过影响 R 点主要阻抑 G_1/S 转移
$p15^{INK4b}$	9p21	Cdk4, Cdk6	被 TGFβ 上调	对生长因子 TGFβ 负调信号反应，主要阻抑 G_1/S 转移
$p18^{INK4c}$	1p32	Cdk4, Cdk6		抑制周期蛋白 D2－Cdk6 的活性，阻抑 Cdk6 磷酸化作用和被 CAK 活化
$p19^{INK4d}$	19p13	Cdk4, Cdk6		抑制周期蛋白 D－Cdk4 激酶活性

p21 是一种广泛的 Cdk 抑制因子，它为 *WAF1*/*CIP1* 基因所编码，它在细胞增殖、分化和衰老调控中均发挥重要作用。在正常人类细胞中，p21 与多种周期蛋白、Cdk 激酶、PCNA 形成稳定的四元复合物，或与周期蛋白、Cdk 激酶形成三元复合物。实验表明，在这些复合物中含有单个 p21 分子时，则形成有活性的复合物，并不抑制 Cdk 的活性，甚至有资料表明具有激酶活性的周期蛋白/Cdk 激酶/p21 的复合物中，p21 可起到促进与稳定周期蛋白/Cdk 激酶的组装(如周期蛋白 D－Cdk4 激酶等)作用等。但当复合物中含有多个 p21 分子时，可使 Cdk 激酶活性被抑制，通过影响 pRb 蛋白的磷酸化和不能释放结合的转录因子

E2F, 导致细胞不能从 G_1 期进入 S 期。引人注目的是, p21 蛋白参与了细胞周期检验点的调控作用, 它是 p53 蛋白在细胞周期 DNA 损伤检验点发挥作用的中介者。当 S 期前 DNA 被损伤时, 导致 p53 水平升高, p53 作为转录因子, 与编码 p21 蛋白的 *WAF1/CIP1* 基因的启动子结合并刺激其表达, 通过抑制相关的周期蛋白 - Cdk 激酶活性, 最后导致损伤的 DNA 不能进行复制, 同时 p21 蛋白也可通过直接与增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)结合, 抑制其活性。已知在依赖 DNA 聚合酶 δ 的 DNA 复制中除了需要 DNA Poly δ 外, 还需要复制因子 C(RFC)和 PCNA 的参与, 当 S 期 DNA 发生损伤时, p21 通过与 PCNA 结合抑制 PCNA 参与的 DNA 聚合酶 δ 的活性, 从而阻抑 DNA 的复制过程(图 8 - 31)。但 p21 并不抑制 PCNA 依赖的 DNA 修复作用, 实验表明, p21 分子的不同结构域对应于不同的靶位, p21 分子 N 端结合并抑制周期蛋白 - Cdk 激酶活性, 在其 C 端则与 PCNA 结合并抑制 PCNA 参与的 DNA 聚合酶 δ 的活性。

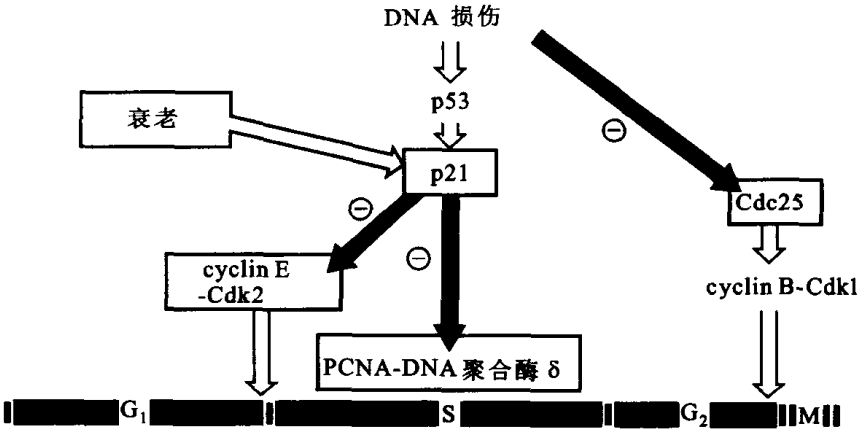


图 8 - 31 CKI 类 Cip/Kip 家族 p21 蛋白主要功能示意图

DNA 损伤通过 p53 转录因子的作用增强 p21 的表达水平, 通过抑制 cyclin E - Cdk2 活性, 阻抑 G_1 期进入 S 期, 并可通过与 PCNA 结合抑制 DNA 聚合酶 δ 活性, 从而阻抑 DNA 复制, 同时, DNA 损伤也可通过影响磷酸酶 $p80^{cdc25}$, 抑制 cyclin B - Cdk1 活性, 作用于细胞不能从 G_2 期进入 M 期。此外, p21 也与细胞衰老作用有关(引自 J. Pines, 1994)

实验表明, p21 不仅在细胞周期运转中发挥调节作用, 而且与肌细胞、软骨等分化过程和衰老细胞老化表型密切相关。此外, 已有资料表明, 在部分肿瘤组织和细胞中, p21 基因定位的 6p21 区缺失, 该现象启示了 p21 基因可能是抑癌基因的侯选者。

$p27^{kipl}$最早作为周期蛋白 E - Cdk2 激酶的抑制因子, 在被 TGFβ 处理或接触抑制的 G_1 期阻断的水貂肺细胞中被发现。通过氨基酸序列分析, 它与 p21 有较高同源性。p27 也是一种广谱的 CKI, 它能抑制周期蛋白 E - Cdk2、周期蛋白 A - Cdk2、周期蛋白 D - Cdk4 等的活性。p27 在 G_0 期细胞中水平高, 在成纤维细胞中对维持细胞静止态是必须的。它主要作用于 G_1 期与 G_1/S 的转移。如将 p27 高表达载体转染人骨肉瘤细胞(Saos - 2), 可诱导该细胞阻断在 G_1 期。p27 也介导了 cAMP 诱导的鼠巨噬细胞 G_1 期的阻抑作用。反之, 表达 p27 反义 RNA 的细胞则被阻止进入 G_0 期, 同时, 研究资料也指出, 当生长因子刺激增殖时, 可观察到 p27 的下降或消失。实验表明 p27 是生长抑制信号与细胞周期阻断的中介者。如 TGFβ 对细胞周期的负调作用可通过 p27 中介, p27 通过抑制 Cdk4 和 Cdk2 激酶等复合物

活性，抑制 pRb 磷酸化和转录因子 E2F 的释放，从而将细胞阻抑在 G_1 期(图 8－33)。其作用机理可能与改变 Cdk2 Thr_{160}区域的构象，从而阻止了该位点的磷酸化有关。此外，实验表明，p27 与一些肿瘤细胞分化有关，在几种人类恶性肿瘤中，p27 的丢失是与它们分化表型的丧失密切相关的。多数资料表明，细胞中 p27 水平的调节主要是通过泛素－蛋白水解酶复合物系统进行调节的。

CKI 家族中另一类是 INK4 系列(也被命名为 p15～p20 家族)。在该系列中以 $p16^{INK4a}$ 和 $p15^{INK4b}$研究较多并受到重视。p16 首先被发现，p16 基因(multiple tumor suppressor gene1，MTS1)定位在染色体 9p21 区，在细胞周期运行中，p16 是一个负调因子，它与 p27 和 p21 不同，p16 只特异性抑制 Cdk4/Cdk6 激酶的活性，它与 Cdk4/Cdk6 激酶结合形成一个不具激酶活性的二聚体，抑制它们对 pRb 的磷酸化，从而使与 pRb 结合的转录因子 E2F 不能释放，导致细胞停滞在 G_1 期。p16 对细胞周期的调控点在 G_1 期 R 点附近，它与周期蛋白 D 竞争结合 Cdk4 激酶并抑制 Cdk4 激酶活性发挥其生长负调作用。前已叙及，周期蛋白 D 在不少肿瘤细胞中过表达，导致生长异常现象，而 p16 则可通过对 Cdk4 激酶活性的下调起着细胞周期异常运转的“刹车”作用。这可能是 p16 抑制肿瘤细胞增殖和 p16 缺失导致细胞癌变和恶化的分子机理之一。近来，在研究 $p16^{INK4a}$基因结构时发现在 p16 位点包含有两个互相重叠的基因，由于这两个基因转录本的阅读框架不同，故编码两种不同的蛋白质，一个编码 $p16^{INK4a}$，另一个编码增殖抑制蛋白如 $p19^{ARF}$(鼠)(ARF：alternative－reading－frame)。$p16^{INK4a}$基因由外显子 1α、2 和 3 编码，$p19^{ARF}$由外显子 1β(位于外显子 1α 上游 13 kb 处)，2 和 3 编码(图 8－32)。实验表明，$p19^{ARF}$($p14^{ARF}$)是一种重要的肿瘤抑制因子和细胞生长调节因子。但与 p16 作用机理不同，它不与 Cdk 激酶结合，而是与另一癌基因产物 MDM2 相互作用，将细胞阻抑在 G_1 期与 G_2 期。实验表明 $p19^{ARF}$[$p14^{ARF}$(人)]可作为细胞生长信号的感受器，通过诱导 p53 作用途径，(它们可通过介导 MDM2 从核质向核仁转移从而增加了 p53 蛋白的稳定性)(见 8.6.4 抑癌基因与细胞增殖)并通过后者作用，导致细胞周期阻抑和凋亡。

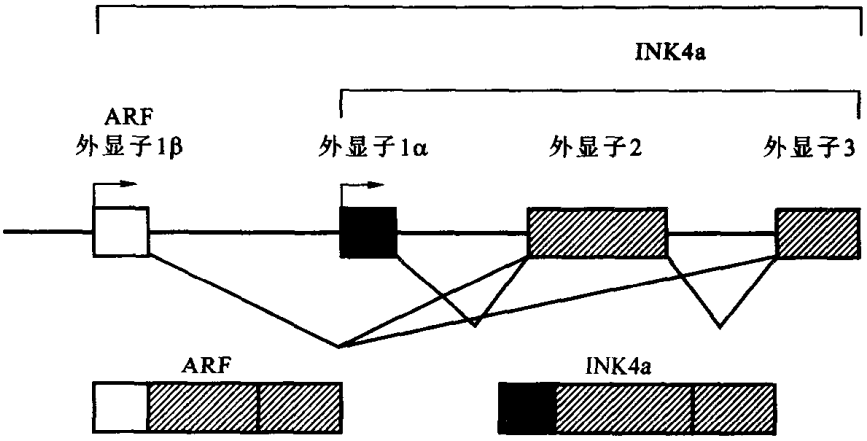


图 8－32 INK4a和 ARF 基因定位图解

$p15^{INK4b}$是 INK4 家族中另一重要成员，它和 $p16^{INK4a}$结构非常相似，具有较高同源性，p15 基因也定位在染色体 9p21 区，与 p16 串联排列。它与 p16 相似，选择性抑制 Cdk4 和 Cdk6 激酶的活性，阻抑 G_1/S 运转，发挥其在细胞增殖中的负调效应，并且可观察到它在癌细胞转化表型的丢失和诱导癌细胞(如人肝癌细胞等)分化中发挥作用。与 p16 不同的是

p15 作用可被生长因子 TGFβ 诱导，如经 TGFβ 处理的 HaCaT 细胞中 p15 mRNA 水平可增加 30 倍，因此，p15 是生长因子信号转导过程的关键中介者。已知染色体 9p21 区域是易发生缺失、突变，产生恶性肿瘤的区域，近年来有不少文献报道 p16 与 p15 基因的缺失或突变与细胞癌变密切有关，目前 p16 已被认为是新的抑癌基因。

综合上述，可以看出细胞周期引擎分子及与细胞周期运转相关蛋白彼此相互作用，共同操作形成了一个调控网络，通过相关的信号转导途径与细胞周期检验点的调节，维持了细胞周期的正常运转与增殖产生正常的子代细胞。如果增殖失控，就可能导致基因突变，增殖、分化异常，细胞发生癌变，甚至死亡。鉴于这些周期调控基因与因子（如周期蛋白 - Cdk 激酶等）表现出在维持机体正常生理功能与防止病变中发挥出的重大作用及在生命科学中具有的重要理论意义和治疗癌症（特别是开辟了治疗癌症新途径）的深远的实践意义，因此发现与细胞周期运转“start”相关基因及其他系列控制细胞周期运转关键基因的 L. H. Hartwell 和发现 Cdk 激酶的 P. Nurse 及发现周期蛋白的 T. Hunt 3 位科学家获得了 2001 年诺贝尔生理学或医学奖。

8.6.2 生长因子

生长因子（growth factor）是细胞增殖调控中的重要因素，它是一类通过与特异的、高亲和性的细胞膜上的受体结合、最终刺激细胞增殖和其他生物学效应的多肽类物质。生长因子受体也普遍存在，很多生长因子受体具有激酶活性，如酪氨酸蛋白激酶、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶等（详见第 10 章细胞的信号系统）。对生长因子与其受体结构、功能和在细胞内信号传递过程及作用机理的研究，对阐明增殖、分化、免疫等重要生命现象具有重要理论意义，而且鉴于生长因子是体内细胞分泌，不具有药物类的毒性，因此对临床治疗与应用也具有实践意义。下面重点介绍一些主要的生长因子如 PDGF、EGF、FGF、NGF 和 TGFβ 等在细胞增殖调控中的作用。

血小板衍生生长因子（platelet - derived growth factor, PDGF）来源于血小板 α 颗粒，是由二聚体组成的蛋白质，相对分子质量为 3.0×10^4 左右。它是一种较强的促有丝分裂因子，大多数二倍体细胞增殖过程中需要 PDGF，特别对 G_0 期细胞被刺激进入增殖过程中具有启动作用。PDGF 发挥在细胞增殖中的作用，必须通过与细胞膜上特异性的受体结合，PDGF 受体是已知的具有酪氨酸蛋白激酶型受体的一个亚族（图 10 - 19）。当 PDGF 与细胞膜上特异性受体结合后，激活了受体酪氨酸蛋白激酶活性，后者与细胞质内含 SH2 结构域的信号蛋白（如 PLCγ 等）结合，使这些蛋白被激活，发挥它们在信号转导中的作用，如通过激酶级联反应，激活 MAPK 等信号通路，最终导致一些与增殖有关的原癌基因表达（详见第 10 章细胞的信号系统）。

表皮生长因子（epidermal growth factor, EGF）是一个含有 53 个氨基酸残基的多肽，相对分子质量为 6×10^3 左右。EGF 是个具多功能效应、作用广泛的多肽。它是一个很强的促细胞分裂因子，对多种细胞增殖具刺激作用，表现出与 PDGF 具协同效应。正如前述，EGF 对细胞的生物学效应是通过和细胞表面专一受体的相互作用进行的。当 EGF 与其受体结合后，通过受体二聚体化发生自身磷酸化，激活了受体酪氨酸蛋白激酶活性。通过作用于 Ras - Raf - MAPK 信号途径和磷脂酰肌醇信号通路，最终影响至细胞核内与增殖有关的转录因子活化和基因的转录如 *c - myc*、*c - fos* 等（详见第 10 章细胞的信号系统）。此外，

EGF 受体酪氨酸蛋白激酶的活化可激活 S6 激酶，而 S6 蛋白的磷酸化可促进核糖体 40S 亚基与 mRNA 的结合，因此，EGF 也参与了对蛋白质合成的调节作用。EGF 不仅与细胞增殖，而且也与细胞转化与癌变有关，实验表明，它能诱导鸟氨酸脱羧酶(ODC)的活性，使多胺类积累，已知多胺是与细胞转化与癌变密切相关的，又如 EGF 亦可增强甲基胆蒽的致癌作用等。

令人注目的是 PDGF 和 EGF 受体与癌基因结构和功能的密切相关性，逆转录病毒的转化基因 *v-sis* 的产物 $p28^{v-sis}$ 蛋白氨基酸的序列与 PDGF 的 B 链同源(详见 8.6.3 癌基因与细胞增殖)，EGF 受体和鸟类成红细胞增多症病毒癌基因 *v-erb-B* 的转化蛋白 $gp65^{erb-B}$ 有相似的氨基酸序列。如从 A431 表皮样癌的瘤细胞中分离出的人表皮生长因子受体，经酶切后，通过对部分多肽片段的分析，发现其中有 6 条肽链与 $gp65^{erb-B}$ 的氨基酸序列的相似性可高达 90%，并且编码 EGF 受体的基因与细胞内原癌基因 *c-erb-B* 的位点均在染色体第 7 号染色体上。此外，实验表明 v-erb-B 编码的蛋白是一个缺少 EGF 结合部位的被截顶的 EGF 受体，显示出 EGF 及其受体可能和癌变有密切关系。

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)家族中的两个主要成员是酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)。两者结构与功能基本相似，aFGF 主要分布于脑组织中，bFGF 存在于神经组织、骨骼、白细胞等。一般说，在活性上 bFGF 比 aFGF 强得多。FGF 对多种类型细胞(如成纤维细胞、血管内皮细胞、软骨细胞、成骨细胞和神经胶质细胞等)均有明显促增殖效应。FGF 受体是跨膜糖蛋白，具有酪氨酸蛋白激酶活性，与 FGF 作用后，受体蛋白通过自身磷酸化而被激活，从而起始了细胞内信号级联反应，可通过多种途径作用于细胞增殖，如磷酸化并激活磷脂酶 C，参与肌醇磷脂代谢，活化蛋白激酶 C 和 Ca^{2+} 的升高，也可通过激活 Raf－MAPK 信号途径将信号传递至细胞核内，刺激与增殖相关的基因表达等。经研究发现，FGF 在体内有广泛的生物学功能。如 bFGF 在早期非洲爪蟾的胚胎发育中可作为胚胎中胚层诱导因子；它可能参与肌肉组织的分化作用；bFGF 可诱导新血管的形成并在伤口愈合过程中发挥重要作用，可促进肉芽组织的形成和伤口愈合。此外，它参与了神经系统的分化与维持，并有报道 FGF 可通过影响免疫细胞参与调节免疫系统功能。

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)在正常神经系统发育、分化及维持神经元特殊功能中具有重要作用，它作用于感觉神经节和交感神经节数目的增加与体积的增大，并能促进触突延伸，诱导产生细胞分化表型。此外，它在神经系统被损伤后的修复和营养中发挥作用，并且可增强特异和非特异性免疫反应，故与免疫调节有关。实验表明，NGF 受体具有酪氨酸蛋白激酶活性，它主要存在于所有来源于神经嵴的细胞膜上，但在肌上皮细胞、人 B 细胞和 T 细胞等细胞膜上也有 NGF 受体的分布，当 NGF 与细胞膜上受体结合后，通过受体蛋白 $gp140^{trk}$ 自身磷酸化，一方面通过活化 Ras 介导的 Raf－MAPK 信号通路，另一方面通过磷酸化磷脂酶 C，激活了磷脂酰肌醇信号通路，影响 Ca^{2+} 增加和蛋白激酶 C 活性增强等，最终作用于细胞核中基因表达，发挥多种生理效应。

转化生长因子 β(transforming growth factor－β, TGFβ)是转化生长因子家族中的主要成员。它是一类具有多功能效应的多肽类物质，广泛存在于正常、癌变的细胞及组织中，它在细胞增殖、分化、骨骼和器官形成、胚胎发育、创伤愈合、免疫调节等生理活动中均发挥重要作用。TGFβ 至少包含 5 种($TGF\beta_1 \sim TGF\beta_5$)，前 3 种在哺乳动物细胞中表达。TGFβ 是

由 $1.2\times10^4\sim1.5\times10^4$ 亚基组成的同源二聚体，它在很多细胞类型（如肿瘤细胞、上皮细胞、胚胎成纤维细胞等）中具有强烈的抑制增殖效应，起着生长负调作用；仅在少数细胞中，特别是在间质来源细胞中表现出刺激生长的效应。Robert（1984）首次报道了 TGFβ 可引起人癌细胞增殖的抑制，它能使纤维肉瘤、肺癌、乳癌等来源的细胞株在软琼脂中的生长受到抑制。近年来，有关 TGFβ 抑制增殖机理的研究有了较深入的进展，通过 TGFβ 对一些上皮细胞的实验表明，TGFβ 将细胞阻滞在 G_1 期。前已叙及，周期蛋白 E－Cdk2 激酶是 G_1 期向 S 期转移的重要调节因子，TGFβ 可通过降低周期蛋白 E 表达和阻抑周期蛋白 E－Cdk2 激酶复合物的形成或通过 CKI p27，p21 作用抑制了 Cdk2 或 Cdk4 激酶的活性，或通过激活 CKI p15 抑制了 Cdk4 的作用，从而抑制了 pRb 的磷酸化，导致了细胞被阻抑在 G_1 期。正如前述，当 TGFβ 作用后，可强烈诱导 CKI p15 mRNA 水平升高和蛋白质合成，后者通过其结合周期蛋白 D－Cdk4 激酶导致 p27 释放，从而增加 p27 与周期蛋白 E－Cdk2 激酶的结合与抑制作用，在 p15 与 p27 协同作用下，进一步增强了 TGFβ 对细胞 G_1/S 的阻抑效应（图 8－33）。

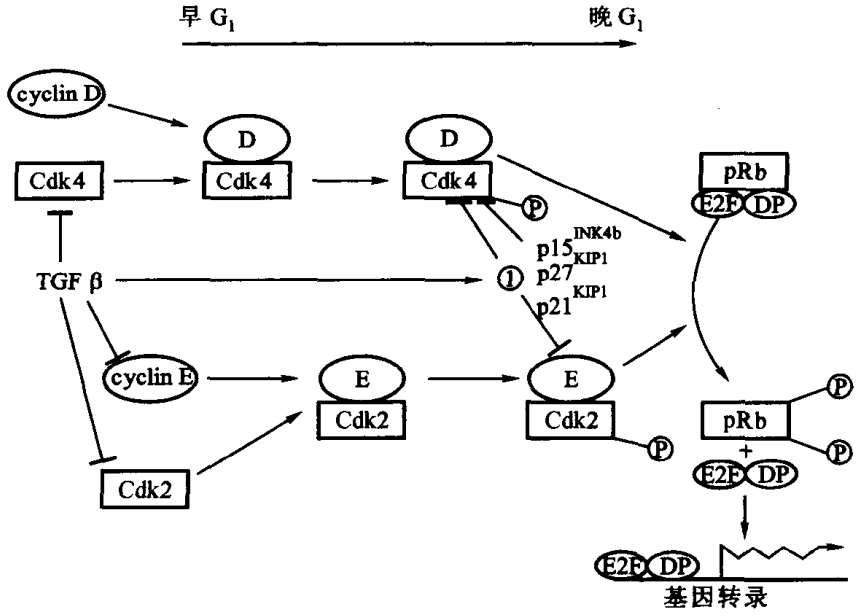


图 8－33　TGFβ 对细胞周期 G_1/S 期运转作用示意图

TGFβ 可通过降低 cyclin E 和 Cdk2 表达与复合物形成或通过 CKI p27，p21 作用抑制了 Cdk4 和 Cdk2 的活性，或通过 p15 作用结合并抑制了 Cdk4 活性，并进一步通过提高 p15 的水平及其与 cyclin D－Cdk4 的结合，导致 p27 释放，从而增加了 p27 与 cyclin E－Cdk2 的结合与抑制作用，进一步阻抑了 pRb 的磷酸化和转录因子 E2F 的释放，导致 G_1 期不能向 S 期推进（引自 R. Derynck，等，1997）

TGFβ 与细胞表面 TGFβ 受体结合后，通过相应的信号转导途径，最终影响细胞核中基因表达。实验表明，在 TGFβ 受体的信号转导中需要Ⅰ型和Ⅱ型受体的异二聚体复合物，这两种类型受体均为跨膜的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，已知 TGFβ 家族成员在与受体作用过程中，TGFβ 先与Ⅱ型受体结合，然后吸收Ⅰ型受体，在细胞表面形成一个异源聚合体，通过Ⅱ型受体的激酶活性，导致Ⅰ型受体的激活，Ⅰ型受体被激活后，磷酸化一类被称为 Smad 家族的信号蛋白，将信号从细胞质传递至细胞核中，在相关的共活化因子的协同作用下，影响基因表达，发挥多种生理效应（图 8－34）。

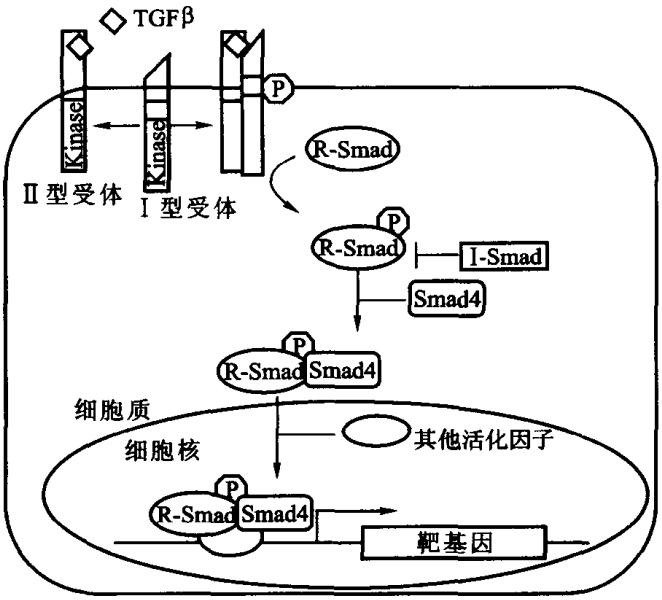


图 8－34 TGFβ－Smad 信号通路示意图

R－Smad:受体活化的 Smad,如 Smad1,2,3,5,8;I－Smad:抑制型 Smad 如 Smad6,7

除上述生长因子及受体外,尚有胰岛素生长因子、T 细胞生长因子及受体等。综合一些生长因子的特性与作用,见表 8－4。

表 8－4 一些生长因子及其主要作用

生长因子	相关的家族成员	作用靶细胞的特异性	主要生理作用
血小板衍生生长因子 PDGF[(PDGF－AA)、(PDGF－AB)、(PDGF－BB)]		广泛	刺激多种类型细胞增殖,如成纤维细胞、平滑肌细胞、神经胶质细胞等,特别是 G_0 期细胞进入增殖过程
上皮生长因子(EGF)	转化生长因子 α TGFα	广泛	刺激多种类型细胞增殖,如皮肤细胞、角膜上皮、成纤维细胞、成骨细胞、乳腺上皮细胞等。在胚胎发育中可作为诱导信号
类胰岛素生长因子(IGF－Ⅰ)	IGF－Ⅱ 胰岛素	广泛	刺激细胞代谢,与其他生长因子协同,刺激细胞增殖
转化生长因子－β(TGFβ)多种亚类	骨形态发生蛋白,BMPs 等	广泛	刺激或抑制细胞增殖(取决于细胞类型),调节一些类型细胞分化、创伤愈合、细胞外基质形成。在胚胎发育中作为诱导信号
成纤维细胞生长因子(FGF)多种亚类		广泛	刺激多种类型细胞增殖,在胚胎发育中作为诱导信号,促血管生长与加速创伤愈合,参与调节免疫系统功能
白细胞介素－2(IL－2)			刺激活化 T 细胞增殖与刺激 B 细胞增殖
神经生长因子(NGF)	脑衍生的嗜神经因子等,BDNF		促进轴突延伸,对正常神经系统发育、分化及维持神经元具有特殊功能

8.6.3 癌基因与细胞增殖

逆转录病毒癌基因(v－onc)和细胞癌基因(c－onc)的发现,为正常细胞和肿瘤细胞增殖的研究开拓了新的和重要的研究途径。已知病毒癌基因(v－onc)是通过转导(transduction)作用从宿主细胞原癌基因中掳获过来的。通常将病毒癌基因在细胞中的同源基因称为 c－onc,未活化的 c－onc 称为原癌基因(proto－oncogene)。现已发现百种以上的癌基因(oncogene),一部分存在于致癌逆转录病毒和动物细胞中,另一些在病毒中不存在,而是通过细胞转染实验、基因扩增和易位的研究从细胞中发现的。表 8－5 表示已鉴定的部分转化逆转录病毒及其癌基因。

大量的研究工作表明癌基因和原癌基因在细胞增殖和转化中均具有重要的调节作用,特别是原癌基因在正常细胞的生长、发育、分化中均起着重要的作用,从而开阔了一条研究与阐明细胞生长、分化和发育的新途径。目前已知的与增殖有关的原癌基因与癌基因有下列 4 类,即生长因子类、生长因子和激素受体类、细胞内信号转导(换)子和核转录因子类。

表 8－5 部分存在于转化逆转录病毒中的癌基因

癌基因	逆转录病毒和动物来源	原癌基因产物功能	病毒诱导的肿瘤
abl	Abelson 鼠类,白血病病毒 小鼠,猫	酪氨酸蛋白激酶	前 B 细胞白血病,肉瘤
erb－B	鸟类溶血病毒,鸡	酪氨酸蛋白激酶 EGF 受体	红白血病 成纤维肉瘤
fes	猫 SV,猫/鸡	酪氨酸蛋白激酶	肉瘤
fms	MeDonough 猫 SV,猫	酪氨酸蛋白激酶 巨噬细胞克隆刺激因子(M－CSF)受体	肉瘤
fos *jun*	EBJ 骨肉瘤病毒,小鼠, 鸟 SV－17,鸟	产物形成 AP－1 转录因子	骨肉瘤,成纤维肉瘤
kit	猫 SV,猫	酪氨酸蛋白激酶 Steel 因子受体	肉瘤
raf	SV,鸡/小鼠	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 被 ras 活化	肉瘤
myc	鸟髓细胞瘤 MC29,鸡	HLH 家族的转录因子	肉瘤,髓细胞瘤,癌
Ha－ras	Harvey 鼠类 SV,大鼠	GTP 结合蛋白	肉瘤,红白血病
Ki－ras	Kirsten 鼠类 SV,大鼠	GTP 结合蛋白	肉瘤,红白血病
rel	火鸡	与 NFκB 相关的转录因子	网状内皮组织增生症 (reticuloendotheliosis)
sis	猿猴 SV,猿猴	血小板衍生生长 因子(PDGF)B 链	肉瘤
src	RSV,鸡	酪氨酸蛋白激酶	肉瘤

主要引自 B. Alberts, 1994

8.6.3.1 生长因子类

一些癌基因(如 *sis*)编码的蛋白在生长调控途径中传递生长刺激信号的重要方式之一是癌蛋白本身可模拟生长因子,与相应受体作用,通过细胞内信号传递,对细胞产生刺激增殖作用。在前节中提及 *v-sis* 癌基因产物 $p28^{v-sis}$ 与 PDGF B 链很相似,已知 PDGF B 链的 N 端 109 个氨基酸与 $p28^{v-sis}$ 的氨基酸序列具有很高的同源性,仅有 3 个氨基酸被取代。$p28^{v-sis}$ 与 PDGF 结构上的相似性,表明 $p28^{v-sis}$ 可能模拟 PDGF,与膜上 PDGF 受体结合后,引起 SSV 转化细胞以自分泌(autocrine)方式失控生长。实验表明,如加入 PDGF 抗体于 SSV 转化的细胞中,可部分抑制它们的生长。正由于转化细胞中癌基因产物具有生长因子的功能,存在自分泌生长的特点,所以转化细胞表现出在不加外源生长因子的条件下自主性生长的特点。

8.6.3.2 生长因子和激素受体类

已知在该类中一些癌基因与原癌基因编码具有酪氨酸蛋白激酶活性的细胞表面受体蛋白或编码细胞内激素受体。较典型的如由鸟类成红细胞增多症病毒(AEV)所携带的癌基因 *v-erb-B* 编码的蛋白是一个截顶的 EGF 受体,它失去了受体的 EGF 结合区,但保留了 EGF 受体的跨膜和激酶结构区域。根据这个结构特性,这些致癌基因蛋白可能模拟已结合配体的生长因子受体,因此在无外源性生长因子时也能不断提供增殖信号,导致生长失控。综合上述,不难看出癌基因可通过编码生长因子或生长因子受体,调节细胞增殖与引起调控异常导致癌变的可能作用途径,从而将癌基因参与细胞增殖调控的途径与生长因子及其受体沟通起来。另一个存在于人结肠癌中的癌基因 *trk*,其编码的产物是膜蛋白,后来发现其对应的原癌基因编码的产物是糖蛋白 $gp140^{trk}$,实验表明,该蛋白是神经生长因子 NGF 的受体,具有酪氨酸蛋白激酶的活性。此外,已证实原癌基因 *c-fms* 编码的蛋白是集落刺激因子(CSF-1)的受体。在该类中的另一些原癌基因可编码细胞内激素受体,如甲状腺激素受体是原癌基因 *erb-A* 编码的产物等。

8.6.3.3 细胞内信号转导(换)子

这一类原癌基因和癌基因编码的产物作为细胞内信号转导子(intracellular signal transducers),它们能将从受体接受的信号传递至细胞内相关的靶产物,在信号转导过程中起作用。在该类基因中根据其产物的性质与功能主要分为酪氨酸蛋白激酶类、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶类和 *ras* 基因家族等。其中编码产物属于非受体的酪氨酸蛋白激酶(protein tyrosine kinase, PTK)类有 *src*、*abl*、*fes* 等原癌基因,这类蛋白中不少具有长链脂肪酸,使它们能部分地与质膜结合,因此,这些具有酪氨酸蛋白激酶活性的蛋白也能发挥其在信号转导过程中的作用。如 *src* 原癌基因编码的蛋白 $pp60^{src}$ 位于质膜的内表面,它是一个多功能的蛋白质,它使有关的细胞骨架蛋白磷酸化,当其表达异常时,会导致细胞转化表型的变化。前已叙及,不少信号蛋白中含有 SH(Src homologies)结构域(如 SH2 和 SH3)。这些具有 SH2 和 SH3 结构域的信号蛋白和癌蛋白,它们可作为蛋白特定结合区域分别在信号转导过程和细胞转化中发挥重要作用(见第 10 章细胞的信号系统)。

在该类中另一些原癌基因编码的产物具丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性,如 *raf*、*mos* 等,它们定位在细胞质中,在细胞增殖和信号转导过程中起重要作用。具有激酶活性的 Raf 蛋白是开关受体酪氨酸蛋白激酶进行信号转导的重要中介者,Ras 的活化,使 c-Raf 激酶活

化，并在蛋白激酶 C 某些亚类的作用下，使 c－Raf 激酶完全被激活，后者通过激活 MEK－MAPK 信号通路，磷酸化细胞内一系列底物，如一些具有转导因子作用的原癌基因产物 c－Jun、c－Fos 等，刺激与增殖相关的基因转录，从而发挥在细胞增殖调控中的作用（图 10－22）。另一种属于该类的原癌基因 *mos* 产物参与了细胞周期的调节。经鉴定表明，它与减数分裂进行密切有关，如在 *Xenopus* 第一次减数分裂期间，Mos 对孕酮的刺激产生应答，可能通过激活 MPF 和 MAPK，引起 GVBD 发生，又如通过 Mos 被敲除的小鼠实验，也表明了 Mos 对减数分裂中期Ⅱ的阻滞是必须的。实验表明，Mos 可通过激活 MAPK 参与信号转导，它位于 MAPK 信号上游，可通过磷酸化并激活 MEK1 等信号系统在一些生物体中发挥其生理效应。

在该类中另一个重要成员是 *ras* 基因家族。已知有 *ki－ras*、*Ha－ras* 和 *N－ras* 等。它们编码的蛋白质相对分子质量为 2.1×10^4 左右，主要定位在细胞膜的内表面。从酵母到人，*ras* 基因普遍存在，表现出在进化上的高度保守性。Ras 蛋白在细胞增殖和分化调控中起重要作用，实验表明，生长因子和具有酪氨酸蛋白激酶活性的受体及非受体型的癌基因产物均需要功能性 Ras 传递刺激增殖或诱发肿瘤的信号，因此它是多种信号转导的中介步骤。有关 Ras 信号通路将在第 10 章细胞的信号系统中介绍，在此不再赘述。正如前述，*ras* 基因产物 p21 具有 G 蛋白的作用，已知 p21 蛋白与 GTP 结合的活性形式具有 GTP 酶活性，但当 *ras* 基因突变后，这些突变的 p21 蛋白 GTP 酶活性下降，保持了 p21－GTP 结合的活性形式，维持了对生长刺激失控的“开放”状态，导致增殖和分化的异常，甚至癌变。实验表明，*ras* 基因的表达与细胞周期的前进密切有关，如将动物的肝脏进行部分切除，发现手术后的肝脏在 24 h 后 DNA 合成增加，同时 *c－ras* 基因转录水平也升高；又如当显微注入 *v－ras* 癌基因至静止的 3T3 细胞中可刺激 DNA 合成等。

ras 基因不仅与细胞增殖密切相关，通过多种癌基因的致癌实验模型也显示出 *ras* 基因在细胞癌化中的作用。已有研究资料表明，一类癌基因（如 *c－myc* 等）的作用使细胞无限增殖（immortalization），第二类癌基因（如 *Ha－ras*，*N－ras* 等）则可能与肿瘤细胞的表型有关。

8.6.3.4 核转录因子（nuclear transcription factor）

该类癌基因编码的产物在细胞核中，属于该类癌基因主要有 *c－myc*、*c－jun*、*c－fos* 等，它们编码的蛋白接受来自外界的刺激信号，通过与核内特定的 DNA 调节序列结合，从而作用于基因的转录与表达，发挥它们在细胞增殖、分化和转化等方面的调节作用。

c－myc 广泛存在于从酵母到人的基因组中，它在细胞增殖过程中发挥重要作用。实验表明，*c－myc* 表达具有细胞周期特异性和发育阶段特异性，它作用于细胞从 G_0 期或 G_1 期进入 S 期。在静止细胞中，*c－myc* 一般低水平表达，但在生长因子如 PDGF、EGF 刺激下 *c－myc* 表达明显加强；又如当细胞中表达外源 *c－myc* 基因时，可在生长因子缺乏的条件下诱导 DNA 的合成，反之，*c－myc* 反义寡聚核苷酸及抗 *c－myc* 蛋白的抗体则可以抑制细胞的增殖。*c－myc* 不仅与细胞增殖有关，同时也与分化有关，如在一些白血病细胞系中均有 *c－myc* 的过表达，但经诱导分化剂处理后，*c－myc* 基因表达迅速下降。实验表明，*c－myc* 之过表达可抑制细胞进入终末分化。

近年来的研究进一步阐明了 c－Myc 蛋白刺激增殖的分子机理与作用于细胞周期调节

蛋白有关。研究资料表明，细胞周期调节蛋白 $p80^{cdc25A}$和 $p80^{cdc25B}$是 c－Myc 蛋白的作用靶物，已知 c－Myc 蛋白是转录因子，它与另一蛋白 Max 共同作用，与 Cdc25A 和 B 基因调节序列结合，导致 Cdc25A 等的 mRNA 水平增加。从而发挥其对周期前进的刺激作用。*c－myc* 基因与癌变也密切相关。当 *c－myc* 表达异常时，可能导致细胞癌变，*c－myc* 在多种肿瘤细胞中出现基因扩增、重排等现象，如在 HL－60 细胞和淋巴瘤中。正如前述，在多种癌基因的致癌实验中，*myc* 基因能使细胞无限繁殖，与 *ras* 基因等一起使原代细胞转化。此外，已有资料表明，在某些因素（如低浓度血清等）存在时，Myc 蛋白的表达能促进一些细胞的凋亡（详见第 11 章细胞的衰老与死亡）。

c－jun 和 *c－fos* 原癌基因编码的蛋白均定位在细胞核中。它们均参与了细胞中信号转导途径，与增殖、分化密切相关。当静止细胞被有丝分裂原刺激时，这类基因表现出快速反应，迅速被诱导转录，故也被称为快速早期效应基因。如静止的人成纤维细胞 WI－38 被血清刺激后 1 h，*c－jun* 基因表达明显增强；在被血清、PDGF 等生长因子刺激的静止期 3T3 细胞中，*c－fos* 基因表达水平也迅速增加，并且早于 *c－myc* 基因表达。实验表明，c－Jun 蛋白同源二聚体或 c－Jun 与 c－Fos 蛋白异源二聚体是转录因子 AP－1 的组成物。AP－1 可与多种基因的启动子和增强子结合，刺激基因的转录作用，它可识别并结合 DNA 顺式元件 TRE（TPA－response element－TGACTCA－），刺激胶原酶基因及其他有关基因的转录，参与细胞增殖等调控过程。已知 c－Jun 蛋白可在蛋白激酶 C 和 MAPK 信号通路的作用下，分别通过 c－Jun 蛋白 C 端的去磷酸化和 N 端的磷酸化的双重修饰作用，导致 c－Jun 蛋白强烈的调节转录效应（图 10－22）。*c－fos* 编码产物 c－Fos 蛋白除了与 c－Jun 形成转录因子 AP－1 参与对细胞增殖的调节外，*c－fos* 也被认为与细胞分化过程有关，如一些单核细胞分化过程的晚期阶段，*c－fos* 转录水平明显增强。

综合上述的几类不同的原癌基因与癌基因在细胞中的定位及其活性可见图 8－35。不难看出，原癌基因的正常表达是细胞增殖、分化和发育等调控系统中的重要组成部分。但是当原癌基因被异常活化（如逆转录病毒转导、原病毒插入、点突变、基因扩增、染色体易位等）导致原癌基因结构改变或基因产物过量和表达异常，继而通过复杂的相互协调作用，最终导

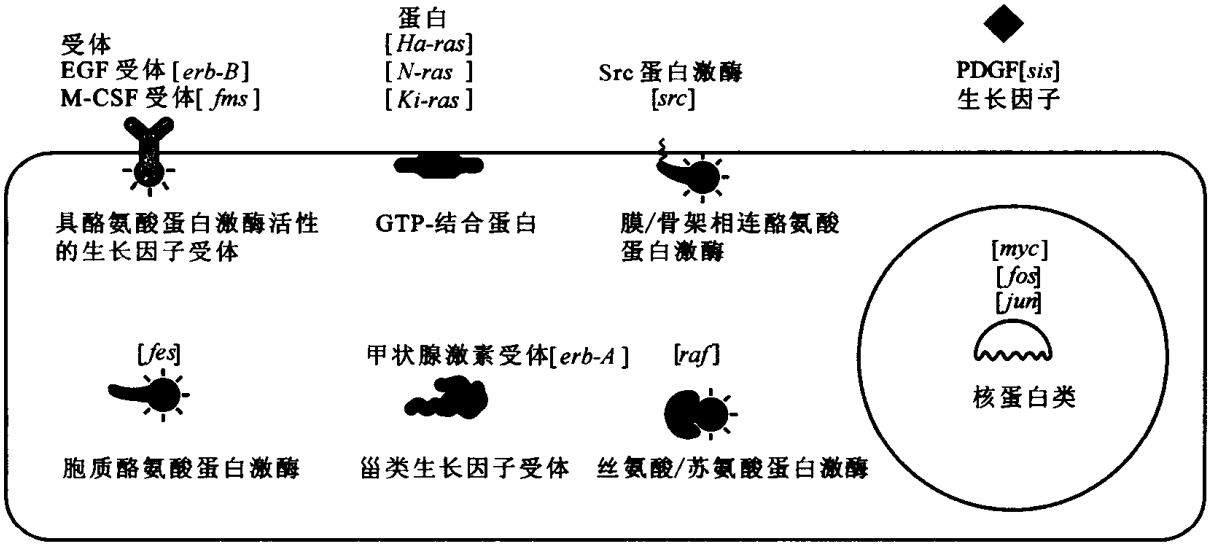


图 8－35 已知不同类型的主要的原癌基因在细胞中的定位及活性（引自 B. Alberts, 1994）

致增殖失控，甚至癌变。如膀胱癌中的 *ras* 基因点突变即在蛋白质编码区第 35 对碱基对的位置上，由 T→G 后造成原癌基因结构改变，导致基因产物异常活化；又如异常活化的 *c-erb-B* 的产物为截顶的 EGF 受体，可使细胞处于不存在生长因子情况下持续受到生长刺激的异常增殖失控状态；此外，神经母细胞瘤中 *N - myc* 原癌基因的扩增与肿瘤的进展有关，而染色体易位重排导致原癌基因 *c - myc* 的被激活，可能与诱发淋巴细胞癌变密切相关。虽然单个原癌基因的异常活化与癌变有关，但多数学者认为癌变是多种癌基因发挥协同作用的结果，它是一个多阶段多步骤的病理过程。

近年来在研究与细胞增殖、分化、发育密切相关的细胞凋亡机理中，发现了另一类重要的原癌基因 *bcl - 2*，该基因编码一个相对分子质量为 2.6×10^4 的膜附着蛋白，它的表达与抑制细胞凋亡有关(见第 11 章细胞的衰老与死亡)。

8.6.4 抑癌基因与细胞增殖

早在 20 世纪 70 年代初，就已观察到将正常二倍体细胞与癌细胞融合后形成的杂交细胞无恶性表型，而且将其接种到适当宿主后亦不再成瘤。这种杂交细胞在体外培养过程中呈现分化、衰老，但也有少数细胞通过传代，最终恢复了恶性表型，这可能是由于特定染色体丢失所形成的。上述现象表明了在正常细胞中可能含有调节细胞生长、抑制肿瘤形成的基因，其丢失或失活有助于细胞癌变。一般认为原癌基因被激活导致癌变是显性的，即一个等位基因被活化即可显示其致癌作用，而上述染色体丢失造成癌变现象表明，在正常二倍体细胞中存在抑制癌变的隐性基因，而且它们仅在两个等位基因都缺失或失活的情况下才能发生癌变，现将这些抑制肿瘤形成的基因称为抑癌基因(tumor suppressor gene)。

20 世纪 80 年代首次分离与克隆的第一个抑癌基因，是人成视网膜细胞瘤 *Rb* (retinoblastoma)，近些年来已分离与鉴定的抑癌基因有十多个，除 *Rb* 外，有 *p53*、*DCC*、*WT - 1*、*NF1*、*NF2*、*APC*、*MTS1* 等，这些基因编码的蛋白质广泛分布于细胞中，参与细胞增殖、凋亡等生命活动的调节过程。这些抑癌基因缺失或突变时，可能导致增殖、分化失控，细胞发生癌变。

Rb 基因定位在人染色体 13q14 上，它编码的蛋白质 pRb 定位在细胞核中，其相对分子质量为 1.1×10^5 ($p110^{Rb}$)，在该蛋白家族中，还有与其相关的两类蛋白即 p107 和 pRb2/p130，pRb 广泛存在于不同组织中，当 *Rb* 二个等位基因丢失或失活时，会导致细胞癌变。实验表明，Rb 蛋白(pRb)是一个具有 DNA 结合活性的细胞生长负调控因子，和细胞增殖与转化的调节有关，如将正常的 *Rb* 基因重组真核表达载体转染成视网膜细胞瘤和骨肉瘤细胞株，不仅能抑制肿瘤细胞的增殖，而且也抑制其恶性表型。实验表明，pRb 在丝氨酸/苏氨酸残基上可被磷酸化，而磷酸化是 pRb 功能的重要调节因素，pRb 可和许多与增殖调节相关的转录因子结合，但当 pRb 处在去磷酸化状态时，它结合的转录因子不能发挥刺激基因转录的作用，只有当 pRb 被磷酸化时，引起这些转录因子释放与活化，才能刺激相关基因的表达。因此，去磷酸化或低磷酸化状态的 pRb 具有增殖抑制活性。一般说，pRb 在 G_0 期和 G_1 期早、中期以去磷酸化或低磷酸化形式存在，在晚 G_1 期磷酸化水平升高，在 S 期与 G_2 期保持高磷酸化状态，当细胞通过有丝分裂后重新恢复至去磷酸化状态。因此在快速分裂的培养细胞中主要以磷酸化 pRb 为主。实验表明，pRb 磷酸化取决于周期蛋白 - Cdk 激酶的作用，已知周期蛋白 D - Cdk4/6 激酶、周期蛋白 E - Cdk 激酶和周期蛋白 A - Cdk2 激

酶等均能使 pRb 磷酸化，正如前述，当 pRb 被磷酸化后，导致与 pRb 结合的转录因子 E2F 释放，从而激活了与 S 期事件有关的基因转录，作用于细胞进入 S 期(图 8－26)。近年来研究资料表明，非磷酸化或低磷酸化的 pRb 作为生长负调因子，除了与 E2F 等转录因子结合阻抑它们的活性外，它可抑制 3 种 RNA 聚合酶的活性(pol Ⅰ、pol Ⅱ、pol Ⅲ)，因此影响细胞内生物合成；pRb 能与 cAb1 相互作用，后者是一种酪氨酸蛋白激酶，它在 S 期能提高转录作用，pRb 的磷酸化作用与释放并激活 cAb1 激酶活性密切相关。此外 pRb 还可通过与 MyoD 作用，与细胞终末分化有关。(图 8－36)。也有资料表明，如将外源 Rb 基因引入骨肉瘤 Saos－2 细胞，可促进 Saos－2 的分化；又如小鼠红白血病细胞被诱导分化后，Rb mRNA 水平明显增加等。

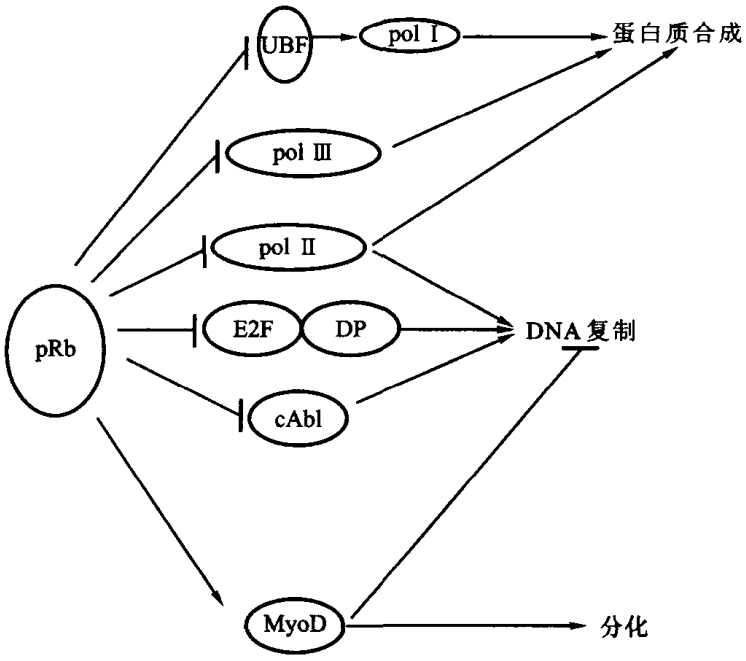


图 8－36 pRb 多种功能示意图
pRb 作为生长负调因子，可通过抑制 pol Ⅰ、pol Ⅱ、pol Ⅲ影响细胞内生物合成，与 E2F 转录因子和原癌基因产物 cAbl 作用，影响其活性，当 pRb 磷酸化后，使这些因子释放并被激活，此外还可通过与 myoD 作用，与细胞终末分化有关(引自 Stein G.S, 等，1999)

在细胞增殖调控中起重要作用的另一个抑癌基因是野生型 *p*53 基因。它编码一个相对分子质量为 5.3×10^4 的蛋白质，由 393 个氨基酸残基组成。人的 *p*53 基因定位在 17 号染色体上，p53 定位在细胞核内，其半衰期很短。一般认为它是肿瘤抑制因子，通过作用于细胞周期检验点影响细胞周期前进和诱导细胞凋亡。不少学者认为 p53 促进细胞凋亡是抑制肿瘤生长的主要原因之一。

p53 蛋白在细胞生长调节中具有重要作用，特别是在 DNA 损伤检验点中表现出的调控作用。前已叙及，当细胞处于一些不利因素条件下(如 X 射线照射等)导致 DNA 损伤时，细胞可通过 DNA 损伤检验点的调节，导致细胞不能从 G_1 期进入 S 期和从 G_2 期进入 M 期。在该过程中，p53、p21 等发挥重要作用，p53 蛋白能使带有损伤 DNA 的细胞停止在 G_1 期。一般情况下，p53 是不稳定的，但是 DNA 受损后，可能通过 p53 的磷酸化作用导致 p53 稳定性加强与 p53 水平之升高，而 p53 作为转录因子与编码 p21 蛋白的基因 *WAF*1/*CIP*1 启动子结合，通过激活 p21 基因启动子，促使 p21 蛋白的合成，后者通过抑制相关周期蛋白－Cdk 激酶的活性，影响了 pRb 蛋白的磷酸化和一些与进入 S 期相关的转录因子的释放，导致细胞不能从 G_1 期进入 S 期，此外，在 X 射线照射条件下，p53 可通过抑制 Cdc25C，使 G_2 期不能进入 M 期。通过上述机理(图 8－31)保证有充足的时间使损伤的 DNA 得以修复，

从而避免了错误信息的转录，也保证了遗传性能的稳定。如果 DNA 损伤不能得到有效修复，p53 也可能诱导细胞凋亡（见第 11 章细胞的衰老与死亡）。但是如果两个 *p53* 等位基因发生突变，导致野生型 *p53* 的钝化，该调控过程不能正常进行，则使得损伤的 DNA 进行复制，产生了基因突变和重排，也就可能导致细胞恶性转化。这是抑癌基因通过对细胞周期检验点的调控作用于人体健康的重要例举。近年来研究表明，*p53* 水平与另一类癌基因 *mdm2*（murine double minute 2）的产物 MDM2 有关，MDM2 参与了调节 p53 蛋白的功能，它可以与 p53 蛋白结合并使其失活，因此，当 MDM2 水平升高时，导致 p53 蛋白功能的丧失；反之，p53 蛋白水平之升高，也能相应刺激 MDM2 蛋白的表达，显示出相互影响与制约的协调作用。

野生型 *p53* 基因突变率较高，它出现在许多恶性肿瘤细胞中，突变后使 p53 蛋白构象改变和半衰期延长，*p53* 突变后不仅引起其抑癌活性丢失，而且使细胞表现出恶性转化的特性。

综合上述，不难看出细胞周期引擎分子周期蛋白 - Cdk 激酶、CKI，癌基因，抑癌基因等细胞周期调节蛋白在生长因子及其相关信号通路的作用下，相互协调、共同操作形成了一个调控网络，维持了细胞周期正常运转和细胞的增殖功能（图 8 - 37）。

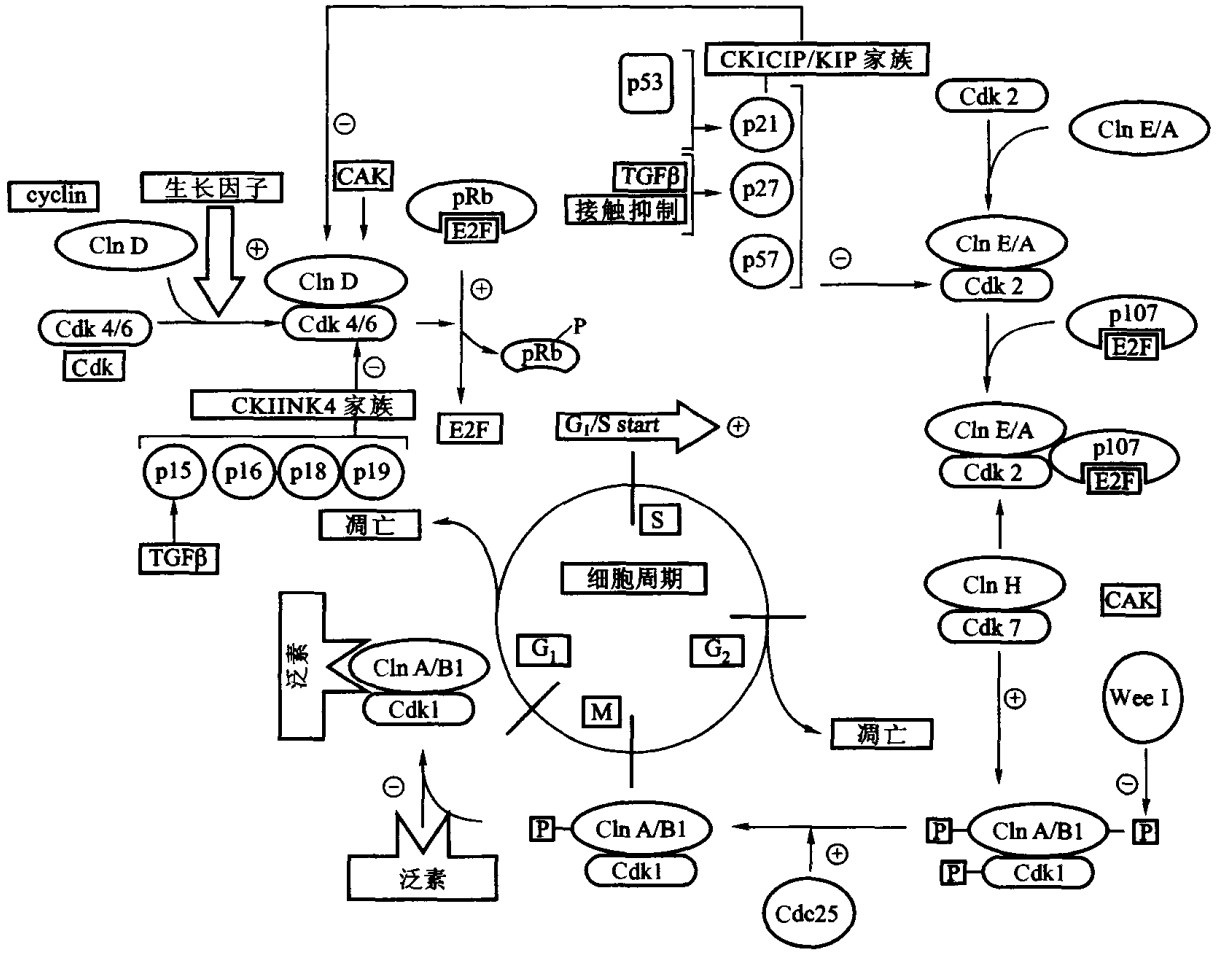


图 8 - 37 在细胞周期运转中，细胞周期引擎分子与多种细胞周期调节蛋白相互作用关系示意图

图中显示出 Cdk 激酶活性之调节需相应周期蛋白（cyclin）、激酶和磷酸酶及 CKI 之作用，并表明了生长因子通过相关信号转导途径与肿瘤抑制因子、转录因子、泛素等在调节网络中的作用，它们相互协调，共同操作维持了细胞周期正常运转。Cln：周期蛋白；Cdk：周期蛋白依赖性激酶；p107：与抑癌基因 Rb 蛋白产物同一家族的蛋白；CAK：Cdk 活化激酶；Cdc25：磷酸酶 $p80^{Cdc25}$；Wee 1：一种激酶；p15、p16、p18、p19、p21、p27、p57：Cdk 抑制因子

内 容 提 要

细胞增殖是生物生长发育的基础，是生命活动的重要特征。细胞增殖是通过细胞周期实现的。细胞周期被划分为 G_1 期、S 期、G_2 期和 M 期。细胞周期时间随细胞种类、生理条件而异。从增殖角度细胞分为周期性细胞、G_0 期细胞、终末分化细胞即不再分裂的细胞。G_0 期细胞可在一定刺激条件下重新进入周期。细胞周期同步化是研究细胞不同周期时相事件的重要方法，在人工同步化中最重要的是采用过量 TdR 二次阻断法进行 DNA 合成阻断和采用药物与 N_2O(笑氧)进行中期阻断法。

细胞周期是高度准确和有组织的时序调控过程。细胞周期检验点的调控可监视和调控周期时相正常运转，从而保证细胞周期中的关键事件高度准确地完成。重要的细胞周期检验点有启动点(start)、R 点、DNA 损伤检验点、G_2/M 检验点、纺锤体组装检验点等。细胞周期检验点受控于一系列特异与非特异环境信号的影响，是基于一系列基因及其产物对外界信号的反应。

在细胞周期各时相中，G_1 期细胞物质代谢活跃，进行 RNA 和蛋白质合成，特别是与 DNA 合成启动有关，需要 G_1 期染色质处于复制前感受状态，即形成前复制复合物(pre－RC)，组成该复合物的蛋白质有 ORC、Cdc6、MCM 蛋白等，在 S 期细胞周期引擎分子的作用下，起始 DNA 复制。在 S 期中进行 DNA 复制和组蛋白合成及核小体组装等主要事件。在 S 期和 M 期，细胞周期引擎分子及相关的周期调节蛋白和泛素－蛋白水解酶复合物的共同作用下，通过前复制复合物的组装与去组装等事件，保证了细胞周期中 DNA 仅复制 1 次。G_2 期主要为细胞进入 M 期所需的结构及功能进行准备。M 期包含核分裂和胞质分裂过程，它被人为划分为前期、前中期、中期、后期、末期和胞质分裂等 6 个时期，通过与有丝分裂进行有关的细胞器的作用及一系列精确、复杂的细胞与分子水平的调控过程，最终将已复制的染色体 DNA 平均分配至两个子细胞中。

减数分裂是细胞有丝分裂的一种特殊形式，它是随配子生殖而出现的，由于不同类群生物的生活史中减数分裂发生的时间不同而分为配子减数分裂、合子减数分裂和孢子减数分裂 3 种类型，但减数分裂的过程和内容在各类生物是基本一致的。减数分裂与有丝分裂的主要不同在于，减数分裂时连续进行两次核分裂(第一次减数分裂和第二次减数分裂)，但染色体 DNA 只在减数分裂前 S 期复制一次，结果所形成的配子染色体数目减少一半；减数分裂前期 I 历时较长，经细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期，染色体发生复杂变化，如同源染色体配对联会、交叉互换、重组、分离等。通过减数分裂使有性生殖物种染色体数目保持相对稳定，同时也是增加变异的一种机制，物种变异的增加有益于进化及对环境的适应。

细胞增殖是多阶段、多因子参与的精确、有序的调节过程，它们相互协调共同操作形成了一个调节网络。细胞周期引擎分子 Cdk 激酶和周期蛋白是细胞周期调控中的重要因子。在哺乳动物细胞中至少存在 9 种 Cdk 激酶，即 Cdk1 至 Cdk9。周期蛋白家族至今已被鉴定出的有周期蛋白 A、B、C、D、E、F、G、H、T 等。Cdk 分别与相应的周期蛋白结合形成异源二聚体，在一些因素调节下表现出激酶活性。其中周期蛋白为调节亚基，Cdk 为催化亚基，不同的周期蛋白－Cdk 激酶复合物通过 Cdk 激酶活性磷酸化不同底物实现其对细胞周期不同时相的推进与转换作用。众多因素参与调节 Cdk 激酶的活性，除与周期蛋白结合外，还

包含有 Cdk 蛋白的磷酸化与去磷酸化作用、蛋白激酶抑制因子(CKI)的作用和泛素—蛋白水解酶复合物的蛋白质降解作用等。泛素—蛋白水解酶复合物可通过对 Cdk 激酶抑制因子的降解和通过 APC(后期促进因子)通路对后期抑制因子和周期蛋白的降解,分别推进 G_1/S、G_2/M、M 中期向后期的推进及进入下一个周期。CKI 类蛋白主要有 CIP/KIP 家族 p21、p27 等和 INK4 家族 p15、p16 等,它们通过与不同的 Cdk 激酶作用调节细胞周期进程。其中一些种类(如 *p*16 等)被认为是抑癌基因。生长因子是细胞增殖调控中的重要因素,主要有 PDGF、EGF、NGF、TGFβ 等。它们分别通过与膜上相应受体结合后,激活受体酪氨酸蛋白激酶或丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性,通过不同信号转导通路,最终影响细胞核内与增殖有关的转录因子活化和基因的转录,从而参与细胞增殖、转化甚至癌变的调节。癌基因与抑癌基因是细胞增殖调控中的关键组分。特别是原癌基因在细胞生长、发育和分化中均起着重要作用,它们被异常活化后可最终导致增殖失控、甚至癌变。目前已知与增殖调控有关的原癌基因和癌基因有生长因子类、生长因子和激素受体类、细胞内信号转导(换)子和核转录因子类等。*Rb* 和 *p*53 是已分离和鉴定出的两类重要的抑癌基因,它们是肿瘤抑制因子。它们的缺失或突变,导致增殖、分化失控与细胞癌变。磷酸化是 pRb 参与增殖功能调节的重要调节因素,pRb 蛋白被 Cdk 激酶磷酸化后通过释放结合的转录因子作用于基因转录,从而推进细胞周期前进。野生型 *p*53 可诱导细胞凋亡,它通过对细胞周期检验点的调控(如 DNA 损伤检验点等)参与了细胞周期正常运转的调节。现认为 *p*53 促进细胞凋亡与抑制肿瘤生长密切相关。

思 考 题

1. 试述细胞周期各时相中的主要事件。
2. 简述细胞周期同步化的主要方法并比较其主要优缺点。
3. 试述细胞周期中的主要检验点及其作用。
4. 有丝分裂后期染色单体分离与向两极移动的机理是什么?
5. 不同生物类群的减数分裂分为哪几种类型?根据什么分的?各存在于哪些类群的生物,各有何特点?
6. 减数分裂与有丝分裂过程比较有何异同点?减数分裂最主要的特征是什么?如何理解通过减数分裂使有性生殖物种染色体数目保持相对稳定、变异性增强、有益于物种进化及对环境的适应。
7. 试述细胞周期引擎分子 Cdk 激酶活性的调节因素。
8. 为何说磷酸化和去磷酸化作用与泛素 - 蛋白水解酶复合物系统的水解作用相互协调,共同操作调节细胞周期进程?
9. 举例说明癌基因与抑癌基因在细胞增殖中的调控作用。

参 考 资 料

1. 汪堃仁,薛绍白,柳惠图主编.细胞生物学.第 2 版.北京:北京师大出版社,1998.436～526
2. 翟中和,王喜忠,丁明孝主编.细胞生物学.北京:高等教育出版社,2000.358～413
3. Alberts B, Bray D, Johnson A, *et al*. Essential Cell Biology. New York and London: Garland Publishing, Inc, 1998.304～311, 547～589
4. Karp G. Cell and Molecular Cell Biology: concept and experiments. 2nd ed. New York. John Wiley and Sons,

Inc, 1999. 608～654

5. Lodish H, Baltimore D, Berk A, *et al*. Molecular Cell Biology. 3rd ed. New York: Scientific American Books, 1995. 1021～1245, 1258～1270
6. Alberts B, Bray D, Lewis J, *et al*. Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. New York and London: Garland Publishing, Inc, 1994. 864～946, 1014～1021, 1273～1294
7. Stein G S, Baserga R, Giordano A, *et al*. The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control. New York: John Wiley and Sons, Inc, 1999
8. Hutchison C, Glover D M. Cell Cycle Control. Oxford, New York: Oxford University Press, Inc, 1995
9. Wuarin J, Nurse P. Regulating S phase, CDKs licesing and proteolysis. Cell, 1996, 85: 785～787
10. Nigg E A. Cyclin－dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. Bio Essay, 1995, 17: 471～480
11. King R W, Deshaies R J, Peters J M, *et al*. How protealysis drives the cell cycle. Science, 1996, 274: 1652～1658
12. Nasmythe K. Separating sister chromatids. Trends Biochem. Sci 1999, 24: 98～104

第9章

细胞分化

细胞分化(cell differentiation)是胚胎细胞分裂后未定型的细胞,在形态和生化组成上向专一性或特异性方向分化,或由原来较简单具有可塑性的状态向异样化稳定状态进行分化的过程。机体一切组织细胞分化时的主要特征是,细胞出现不同的形态结构和合成组织特异性的蛋白质,演变为特定表型的细胞类型。不同类型的细胞分别构成不同组织、器官乃至系统。在多细胞生物中,细胞适应于功能的变化而逐渐在形态上发生相应的改变,如神经细胞的构型是适应于外界刺激所起的反应,将信息从机体一部位传至其他部位的过程中逐渐转变形成的。从狭义上讲,这种功能和形态上逐渐特化的过程,就是细胞分化。个体发育过程中细胞不断特化的结果产生多种不同而稳定的细胞类型,故分化实质上是个体产生稳定性组织差异的过程。

细胞分化发生于生物体的整个生命进程中,但在胚胎期达到最大限度,成为最重要的过程之一。从分子意义上看,细胞分化意味着某些特异性蛋白质的优先合成,如成肌细胞能合成肌球蛋白和肌动蛋白,表皮细胞合成角蛋白,胰岛细胞合成胰岛素等。这是由于在特定细胞中某些基因在一定时间内被激活的结果。近年来,虽然发育生物学已发展到细胞和分子的水平,但从一个简单的受精卵如何转变成具有高度复杂性和结构性的胚胎,各种不同类型细胞的分化过程并未完全研究清楚。本章将围绕胚胎发育的细胞学基础和细胞分化的基因调节来叙述特化细胞的发育。

9.1 细胞决定

细胞分化意味着某些特异性蛋白质的优先合成,以适应某种生理功能。另一方面,从形态上看,大多数细胞适应于特化的功能,在形态上发生相应的改变。这种在结构与功能上逐渐特化的结果,使机体细胞之间产生了稳定性差异,出现了执行不同生理功能的各组织的分化细胞。而在许多情况下,在能识别一个细胞的分化以前,就有了一个预先保证细胞怎样变化的时期,这一阶段通称为细胞决定(cell determination)。细胞在这种称做被决定的状态下,沿着特定类型分化的能力已稳定下来。

9.1.1 细胞分化的潜能与决定

从受精卵发育成整个有机体的各种组织和器官，因此，在发生潜能上受精卵属于“全能”细胞(totipotent cell)。哺乳类在桑椹期的 8 细胞前，细胞均是全能的；两栖类受精卵通过活跃的细胞分裂直至形成囊胚之前，只有数量上的增加而无组织分化。但从原肠胚细胞重排成三胚层后，随着细胞空间关系的改变和微环境的差异，三胚层衍生的未来组织器官的轮廓即开始决定下来，这些细胞在发生潜能上已开始出现一定的局限性，各胚层细胞只倾向于发育为本胚层的组织器官。在以后的发育过程中，逐渐出现了各器官预定区，进一步局限其分化的潜能，具有演变为多种表型的能力，这种细胞称为“多能”细胞(pluripotent cell)。发育过程中，这种逐渐由“全能”局限为“多能”和最后趋向于“专能”细胞(monopotent cell)稳定型的分化趋势，是细胞分化过程中一个普遍的规律。因此，从某种意义上来讲，细胞决定是发育潜能逐渐限制的过程，即选择基因表达的过渡阶段，此时细胞虽尚无可分辨的分化特征，但已具备了向某一特定方向分化的能力。一个典型的例子是果蝇幼虫期的成虫盘(imaginal disc)，所含的细胞虽未分化，但随时间的推移，不同成虫盘分别发育成腿、翅、触角和躯体其他部分。若把一个成虫盘移植到另一幼虫上，这些被移植的细胞不会失去它们的“决定”，仍然能产生成虫的相应部分。由于细胞分化前如何选择基因表达是个非常重要的问题，因此，细胞分化前的“决定”阶段就成为研究细胞分化机理的理想材料。动物胚胎发育的决定时间可用胚胎移植方法来确定，以两栖类为例，如将原肠胚早期预定将发育成表皮的细胞，移植到另一宿主胚胎预定发育为脑组织的区域，被移植的细胞在宿主胚胎中仍然发育成脑组织，而到原肠胚晚期阶段移植则发育成表皮，说明两栖类早期胚胎发育在早原肠胚和晚原肠胚之间的某个时期开始了细胞决定。

9.1.2 卵细胞质在早期胚胎细胞决定中的重要性

在不同动物胚胎发育过程中，细胞决定的时间是不同的，这与卵细胞质中物质分布的不均一性有密切关系。受精卵每次卵裂，细胞核物质包括基因组(genome)都均匀地分配到子细胞中，它们都是等能的，但受精卵的细胞质物质分布及其在子细胞中的分配并不是十分均匀的，有的物质在细胞中有一定的区域分布。这种不均匀性，对胚胎的早期发育有很大影响，在一定程度上决定了细胞的早期分化。这些特殊物质被称为决定子(determinant)，它们在受精卵中的特殊定位以及卵裂时对各子细胞分配的不均匀性，称为细胞质定域(cytoplasm locolization)。

动物生殖细胞的决定是在胚胎发育很早期发生的。果蝇生殖细胞的决定是以在卵的一特殊部位为其特征，像其他许多昆虫一样，受精卵的卵裂只有核分裂而胞质不分裂，结果在一个卵细胞质中含有数千个细胞核，这时的胚胎叫合胞体胚盘(syncytial blastoderm)。在胚盘后端的细胞质区域叫极质(polar plasm)，和其他部分细胞质的区别是极质中含有一些特殊的颗粒叫极粒(polar granules)，这种颗粒含有蛋白质和 RNA，虽然影响生殖细胞分化的活性因子还未搞清楚，但极质对生殖细胞的决定具有直接的影响。在极质区域形成的细胞，其体积比其他细胞大，叫极细胞(pole cells)，它们就是生殖细胞的原基细胞，在以后的发育过程中，极细胞迁移到生殖腺，在那里发育成卵细胞和精细胞。类似于极粒能最终影响生殖细胞分化的成分的物质，即为生殖细胞的决定子，这种影响细胞分化的现象普遍存在于动物界。

若用紫外线照射卵子后部，破坏极质，则发育成的动物将是不育的，如将未照射的极质注射到照射后卵子的后部，则发育成的动物由于接受了新极质的补充而变得可育。这个实验证明极质影响生殖细胞的决定（图 9－1）。

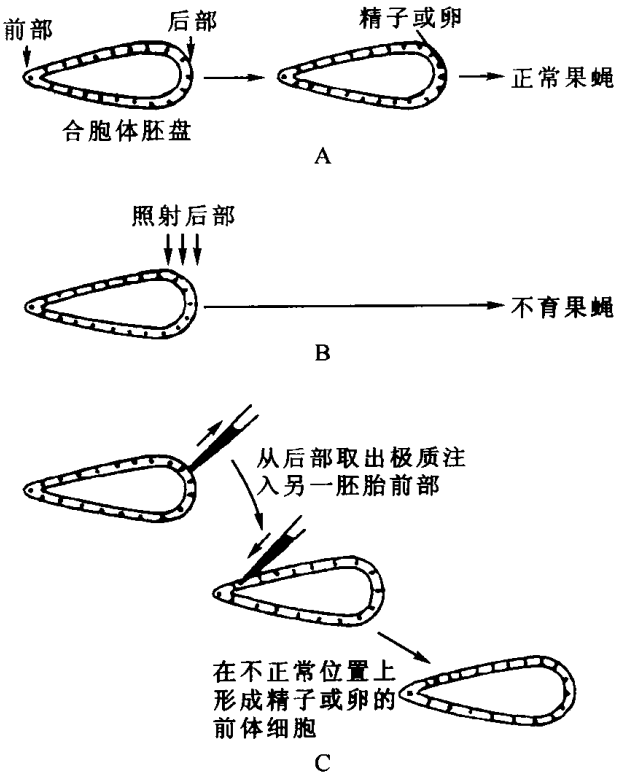


图 9－1　极质在果蝇生殖细胞形成中的作用（引自 M. Okada，等）

果蝇胚盘前部的细胞核在正常情况下演变为其他体细胞，不能形成极细胞，但在图 9－1C 的实验中，在极质影响下却能形成极细胞，这说明昆虫早期胚胎细胞核的发育是多潜能的（multipotential），细胞质对其发育具有一定影响。

哺乳动物早期胚胎细胞的决定表现为细胞分化为滋养层和内细胞团，滋养层细胞将来发育成胚胎的附属结构，只有内细胞团才发育成胎儿。大量的资料证明在 8 细胞期前细胞发育是全能性的，如将小鼠或兔 8 细胞期胚胎分离后获得的任何一个卵裂球，均能培养发育成一个正常的胚泡，将此胚泡植入假母子宫，以激素处理后，最后能发育成正常动物。8 细胞期前细胞具有发育的全能性，这与细胞质的均一性有关。

关于哺乳动物胚胎早期细胞决定的机制，可能与细胞在胚胎内分布位置的影响有关，外部细胞覆盖在胚胎表面就形成滋养层，内部细胞发育成内细胞团。可用以下实验证明：将白色品系鼠的 4 细胞期胚胎分离的单卵裂球再分裂一次，即相当于 8 细胞期的一个卵裂球，把它置于黑色品系鼠 8 细胞期胚胎分离的 4 个卵裂球中央位置，形成一个嵌合体，培养到胚泡期时移植到假母子宫中，结果出生的子代表现为明显的白色品系。可以肯定，这是由内部细胞（即白色品系）构成的胚胎本体发育成的（图 9－2）。实验结果表明，哺乳动物胚胎卵裂期的卵裂球在发育潜能上是全能性的。这时发育的命运尚未被确定，它们发育的决定与它们在早期胚胎中的相关位置有关。而从 16 细胞期开始，有些细胞被包围在内部，可以说这个阶段是哺乳动物早期胚胎细胞决定的时间。

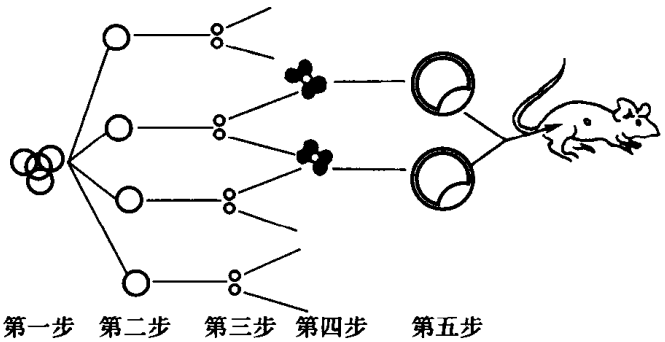


图 9－2　检验“内层－外层”假说的实验
第一步：白色品系 4 细胞期胚胎去透明带；第二步：将卵裂球分离；第三步：卵裂球再分裂一次；第四步：分离的白色品系单个卵裂球置于黑色品系 8 细胞期的 4 细胞中；第五步：混合胚胎培养至胚泡期，植入假母子宫中（引自 Browder，仿 Kelly）

9.1.3 细胞决定的稳定性和遗传性

一旦细胞决定后，沿着特定类型分化的能力是很稳定的和可遗传的，果蝇的成虫盘是这方面的一个典型例子。成虫盘是幼虫体内的处于未分化状态的细胞团，变态后由成虫盘产生相应的腿、翅、触角等成体的不同结构，它们是预先向某种特定类型分化的已决定的细胞团。若将成虫盘移植到成体果蝇腹腔中，可以一直保持未分化状态不断地进行增殖，甚至经过许多次在果蝇腹腔中的移植，取出移植到幼虫体内，当幼虫变态时，被移植的成虫盘细胞便发育成相应的成体结构(图 9－3)。如当初移植到成体果蝇腹腔中的是翅成虫盘，则长成的便是翅，说明成虫盘细胞的决定状态是很稳定并可遗传的，这种稳定性和遗传性并不受增殖多代的影响。

细胞决定是指细胞在接受某种指令或信号分子作用后，在发育中该细胞及其子代细胞便能区别于其他细胞分化成某种特定类型的细胞，即在形态、结构与功能等分化特征尚未显现之前便已确定其不同的分化前途。正如上述果蝇成虫盘细胞决定的移植实验所显示的那样，这种能力是很稳定的和可遗传的。信号分子的作用虽是短暂的，但细胞可将这种短暂的作用记录并储存下来，从而产生长时间的记忆。细胞记忆可将信号分子的作用以某些特定基因的激活或抑制表现出持久不变的稳定状态的方式印记在基因组中。因此，细胞决定与细胞记忆密切相关，也正是具备细胞记忆才能保证细胞决定的稳定性和遗传性。

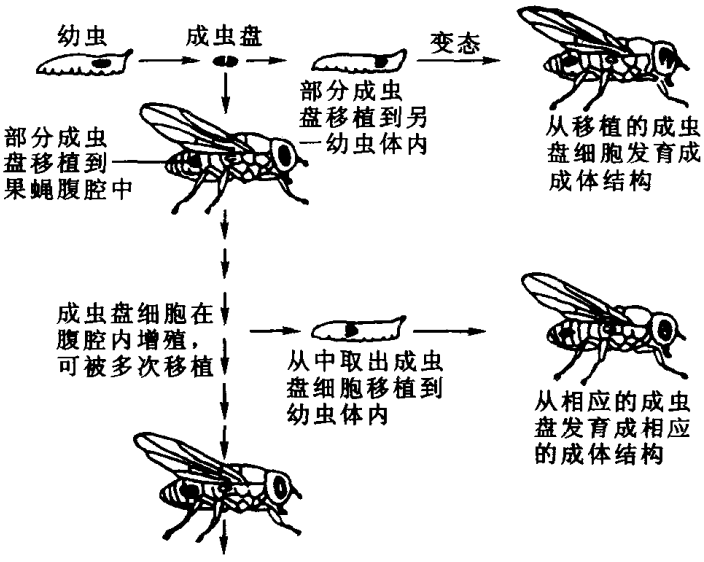


图 9－3 成虫盘细胞决定状态的移植实验

9.2 胚胎细胞分化

许多实验证明，各种类型的细胞所包含的基因组都是相同的，而且和受精卵的基因完全一样。当细胞分化时，某一类型细胞仅有某些基因被激活，结果导致各类细胞合成其特有的蛋白质，以执行其不同的功能。激活或抑制基因表达的因子可来自细胞内，如细胞质的异质性对基因的作用，也可来自细胞外，如胚胎诱导所表现的相邻细胞的作用，以及激素对细胞分化的调节等。

9.2.1 细胞核和细胞质相互作用

细胞核和细胞质彼此互相依赖，以履行细胞的生理功能，一方面是核内染色体上排列的基因控制着细胞质中的成分及其代谢活动，另一方面细胞质对基因的表达也起着调节作用，二者共同构成生命活动中矛盾统一的整体。

9.2.1.1 细胞核对细胞质的作用

以黑白两种肤色的美西螈为材料，黑色为显性，白色为隐性，均由细胞核所控制。实验时，将带有显性黑色基因取自囊胚的核移殖到带有隐性白色基因经紫外线照射处理的无核卵中，在移植后长成的美西螈中，全部出现黑色的表型。说明美西螈的色素是由细胞核控制的，并在以后的胚胎发育过程中未受影响而改变其作用。

9.2.1.2 细胞质对细胞核的作用

细胞质对基因表达也具有调节能力。如把培养的爪蟾肾细胞核注入蝾螈的卵母细胞内，从双向凝胶电泳对蛋白质分析结果显示，原来在肾细胞中表达的基因这时不表达，而原来不表达的基因，这时却被激活。说明卵细胞质中含有某些成分，这些成分控制基因表达的开关，对某些基因能激活，而对另一些基因则起抑制作用。

一个受精卵或某些动物早期胚胎细胞具有相同基因信息，之所以能分化为各种不同类型的细胞，是由于不同基因表达的结果。在细胞分化过程中，由于新的基因产物不断产生，并加入到原来的细胞质成分中，改变胞质成分，使胚胎细胞的基因表达环境不断发生改变，从而使核内基因表达状态不断地受到调整，使胚胎细胞逐步决定、不断分化。在个体发育中，由于细胞核与细胞质间这种相互作用的不断进行，不同细胞的基因在时空上按层次有序地逐个表达或关闭，直至不同的终末分化基因的表达，最终形成各种类型的细胞。

9.2.2 胚胎诱导对细胞分化的作用

某种细胞类型的发育和组织特异性蛋白质合成的启始与不同胚层细胞的相互作用有密切关系。这种相互作用表现为一部分细胞对其邻近的另一部分细胞产生影响，并决定其分化方向的作用，叫胚胎诱导(embryonic induction)。一般发生在内胚层和中胚层或外胚层和中胚层之间，从诱导的层次上看，可分为初级诱导、次级诱导和三级诱导。如脊索中胚层诱导其表面覆盖的外胚层发育为神经板是初级诱导；神经板卷成神经管后，前端膨大成原脑，其两侧突出的视杯再去诱导覆盖在上面的外胚层形成眼晶状体，是次级诱导；次级诱导的产物晶状体又诱导覆盖在表面的外胚层形成角膜，是三级诱导。不同胚层细胞相互作用的结果，导致不同胚层细胞合成组织特异性蛋白质，从而出现组织的分化。

9.2.2.1 中胚层对外胚层的诱导

皮肤是由表皮及其下的真皮组成，表皮和真皮分别由外胚层和中胚层演发而成，皮肤一些区域一般可鉴别的特征如羽毛、鳞片、毛发等衍生物或外表的角质层是表皮细胞分裂及合成特异性蛋白质的结果。

表皮不同衍生物的形成是受位于下端的真皮所控制的，如鸡腿部和翅部的羽毛是不相同的，而在足部则为鳞片。若从早期鸡胚的一个区域取出表皮或真皮细胞，移植至胚胎表面的其他区域，其结果证明是真皮而不是表皮调控衍生物的生长。例如，从腿部取出真皮细胞，移植在胚胎翅原基的表皮下，则从这部分表皮诱导形成腿部类型的羽毛，而不是翅部类型的。但若将腿部表皮移植到足部，并不在足部产生羽毛，而是在移植的表皮上形成鳞片，说明同一区域的表皮能发育形成不同的衍生物(如羽毛和鳞片)，至于形成什么样的衍生物，决定于位于下面的真皮(中胚层)(图 9－4)。

虽然真皮对表皮衍生物的诱导具有决定作用，但在异种移植的情况下，表皮的反应受种

属遗传性的制约。如小鼠的真皮只能诱导培养的鸡表皮细胞形成羽毛原基，而不形成具有小鼠皮肤特征的毛须，因鸡的表皮对于小鼠中胚层的诱导反应决定于鸡本身的遗传性，即产生羽毛而不是毛须。

真皮和表皮的相互作用并不局限于胚胎期，成体动物由外胚层发育成的许多组织、器官的维持和生长分化也依赖来源于中胚层的间充质细胞的作用，它们接受并加工从中胚层发出的信号。

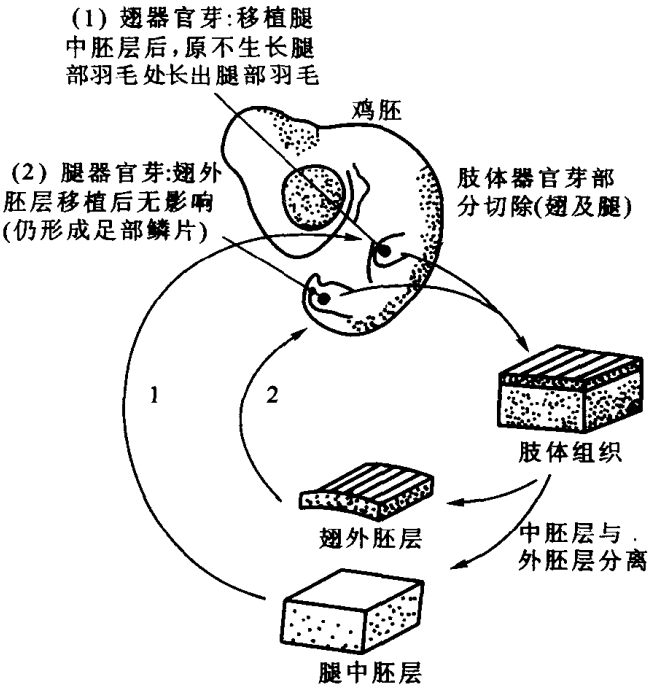


图 9－4 真皮对表皮形成不同衍生物类型的决定作用

9.2.2.2 中胚层对内胚层的诱导

内胚层和中胚层的相互作用对内部器官的形成具有重要作用。消化道开始从内胚层的原肠向中胚层间充质区域生长，两种类型细胞的相互作用，诱导唾液腺、胰腺、肺、肝脏等内胚层细胞向上皮细胞分化。

胚胎任何部分间充质细胞都能促进来源于内胚层的胰腺前体细胞分化为胰腺腺泡细胞，这种细胞含有胰腺消化酶。而内胚层来源的唾液腺或肝脏前体细胞的分化，只有在能与之相互作用的那部分间充质细胞的存在下才能进行。这种间充质细胞只有从胚胎中部心区来源的才有效，而来自胚胎尾部的间充质细胞则不能诱导肝细胞的分化。表明间充质细胞在诱导肝细胞分化中有一定的组织特异性，但无种属特异性。如鸡心脏间充质细胞也能诱导小鼠内胚层细胞分化为肝细胞。

9.2.2.3 胚胎诱导的机理

在研究胚胎诱导分化的机制时，问题集中在不同胚层细胞间相互作用的信息是什么样的物质，这些诱导物是以什么方式对靶细胞进行诱导分化的。尽管进行了不少研究，仍然不十分清楚，尤其是这些诱导物如何调控反应细胞的基因功能，尚有待更多实验进一步证明。

1．位置信息在细胞分化中的意义

在组织器官建成中，细胞受某种发育指令的控制，从而使动物躯体的组织器官的大小、形态受到控制。如肢体的形成不仅需要肌肉、神经、骨骼和皮肤在数量上的增加，而且还需要它们在空间上的不同分布。在特化区域中，细胞生长在空间上的局限性对形态发生具有重要作用，可使特化的组织器官保持一定大小的形态和空间位置。因此，位置信息就是使细胞能正确地按发育指令进行形态建成。

从鸡胚肢体形态的研究可说明位置信息的存在及其重要性。鸡卵受精 3～4 天后，在胚胎长轴两侧形成凸起叫肢芽，肢芽进一步发育成腿或翅。所有肢芽中的细胞类型都是一致的，即外层为外胚层细胞，包围着里面的间充质细胞。间充质以后分化为腿和翅的肌肉、软骨及骨骼等不同组织。

如在软骨、骨骼和肌肉分化前将含有表皮及中胚层细胞的翅芽整个顶部切除，以腿芽的顶部代替，则移植的胚芽细胞将分化成软骨、骨骼、肌肉和皮肤，但形成的肢体结构不像正常的翅，而像腿，完全带有趾、爪及鳞片。因此，虽然 4 天胚龄的腿芽及翅芽在组织学上是相同的，但它们在发育上并不是等效的，显然这是由于它们已接受了不同的位置信息。因此，细胞决定不仅包括使细胞发育为某种特化类型的细胞所需的信息，而且还包括使细胞发育为一定形态的指令。

一些两栖类的成体动物肢体切除后可以再生，这时中胚层细胞形成一肢芽，并且能精确地重现胚胎学事件，产生一个新的肢体。前肢在躯体的前部形成，后肢则在后部形成。再生的某种过程与胚胎发育中表现的细胞分化模式极为相似，说明肢体被切除后，残肢细胞中仍保留着控制细胞分化的特化信息及位置信息，这些信息能刺激肢体的形成。

细胞间相互作用对细胞分化及器官组织的构建具有十分重要的作用，细胞所处的位置不同对细胞分化的命运有明显的影响，改变细胞所处的位置可导致细胞分化方向的改变，这种现象称为位置效应(position effect)。那么，位置信息即为产生位置效应的主要原因，但这种位置信息的物质基础是什么？近年来所积累的实验资料表明，这种位置信息实际上是一种信号分子，它可影响邻近细胞的分化方向。如在鸡胚的原肠胚期，其脊索细胞能分泌一种由 sonic hedgehog 基因所编码的信号蛋白，该蛋白可诱导邻近的神经管细胞分化形成一种叫底板(floor plate)的结构，而距脊索稍远一点，位于底板两侧的细胞则被诱导分化为运动神经元。如将另一脊索移植入鸡胚中线一侧，则以同样方式诱导邻近的神经管细胞分化成底板和运动神经元(图 9－5)。

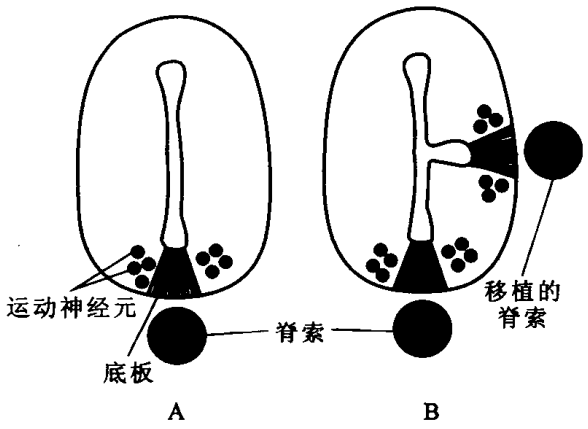


图 9－5 从脊索发出的信号对胚胎中枢神经系统不同类型细胞分化的调控作用

A. 紧靠脊索的细胞接受到最强的信号，分化为底板，稍远的细胞分化为运动神经元；B. 移植于另一侧的脊索对邻近的细胞产生相同的诱导分化作用

如 sonic hedgehog 基因发生突变，会导致小鼠和人的中枢神经系统发育异常，甚至会出现独眼和一个鼻孔的畸胎。

将克隆的 sonic hedgehog 基因制成探针，原位杂交显示 sonic hedgehog mRNA 不仅存在于脊索细胞中，在胚胎的肢芽中亦存在，但仅定位于将来发育为小趾的肢芽后部。如将另一产生 sonic hedgehog 蛋白的细胞团植入将来发育为大趾的肢芽的前部，则在以后发育成的翅上出现错误的趾重复(图 9－6)。每个趾的特征即其大小、形态及内部结构受控于与产生 sonic hedgehog 蛋白的距离即该蛋白的浓度，或受控于该蛋白的某些其他因子的浓度赋予肢芽细胞分化的位置信息，最终发育成由骨、腱和皮肤等构建成的不同的趾。

sonic hedgehog 的例子显示，发育中胚胎不同部位细胞对同一种信号蛋白的分化效应不同，正如 sonic hedgehog 蛋白诱导邻近的中枢神经系统细胞分化为底板和运动神经元，而肢芽细胞则发育为趾，这种现象依赖于不同部位细胞所具有的不同细胞记忆。sonic hedgehog 只是各种信号蛋白家族成员之一，因此，各种不同信号蛋白在诱导细胞分化、构建不同的组织器官中将发挥重要作用。

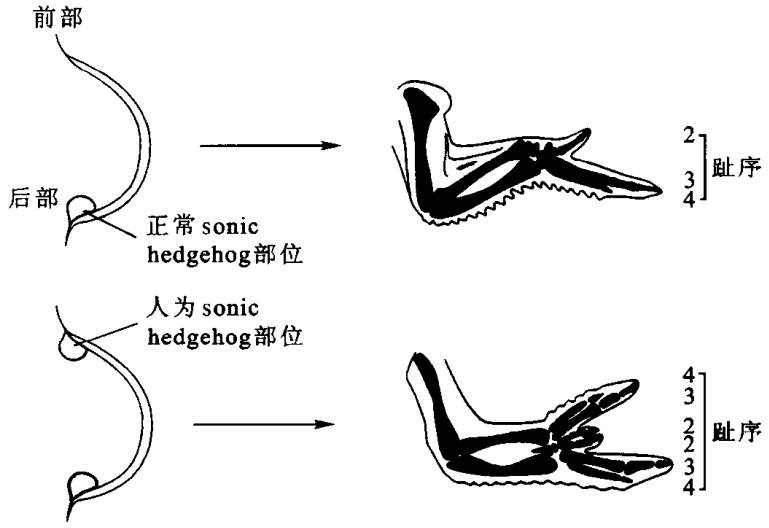


图 9－6 肢体发育中的 sonic hedgehog 信号

sonic hedgehog 的正常表达部位在肢芽后部的一部分细胞，如在鸡翅芽前部人为地提供另一来源的 sonic hedgehog 蛋白，则在以后发育成的鸡翅前部错误地出现趾重复

2．位置信息的信号传递途径

位置信息如何在靶细胞内传递并调节与靶细胞成熟有关的分化基因的表达，弄清这个问题对探明胚胎诱导的分子机理具有十分重要的意义。近来从对果蝇复眼中小眼发育的研究中提供了一些有意义的信息，果蝇小眼中接受紫外线刺激的光受体细胞——R_7 细胞的分化，是受一种同源异形基因——Sevenless(*sev*)基因所控制的。实验证明，果蝇小眼的发育受细胞间相互作用所调节，因此，R_7 细胞所处的空间位置及其与相邻细胞间的关系在 R_7 细胞的分化中是至关重要的。果蝇复眼是由 800 个小眼组成的，每个小眼由 8 个光受体细胞($R_1 \sim R_8$)和 12 个副细胞组成，光受体细胞 R_7 的发育成熟与相邻的 R_8 细胞的作用有密切关系。形态学和遗传学的分析指出，在 R_7 细胞分化中 *sev* 基因的作用在于传递位置信息。*sev* 基因所编码的产物是一种跨膜蛋白，其膜内区段与 *src*、*ros* 等原癌基因所编码的蛋白质及 EGF 受体同样具有酪氨酸激酶活性，并且其氨基酸顺序具有部分同源性。据此认为，该蛋白的质膜外区段可识别并接受来自 R_7 前体细胞与相邻细胞相互作用产生的位置信息，然后激活膜内区段，使靶蛋白酪氨酸残基磷酸化。现已查明，R_8 细胞的 *Boss* 基因编码一跨膜蛋白 Boss[*sev* 基因产物 Sev 蛋白的配体(bride of sevenless)]，当 Boss 与 R_7 前体细胞 Sev 蛋白结合后，使受体二聚化及其酪氨酸残基磷酸化，从而使受体能与 *Drk* 基因(down stream of receptor kinases)所编码的含有 SH3－SH2－SH3 结构域的接合蛋白(adaptor protein)Drk 的 SH2 域结合。接蛋白的 SH3 域则与羧端富含脯氨酸的 *sos* 基因产物 Sos(son of sevenless)蛋白结合，Sos 蛋白是一种鸟苷酸释放蛋白(guanine nucleotide releasing protein, GNRP)，刺激 Ras 的鸟苷酸转换，从而激活 Ras。在此过程中，一旦 Ras 被激活，即使 GAP[GTP 酶激活蛋白(GTPase activating protein)]处于抑制状态，亦不能阻断 R_7 细胞的发育，因为此时 Ras 与其信号通路的下游分裂素激活蛋白激酶(MAP kinase, MAPK)系统发生偶联，所以，Ras 被受体酪氨酸激酶的活化主要依赖于 GNRP 而不是 GAP(图 9－7)。活化的 Ras 与丝氨酸/苏

氨酸激酶 Raf(MAPKKK)结合，激活 Raf。活化的 Raf 再通过 Mek(MAPKK)激活 MAP 激酶(MAPK)，MAPK 通过对一些核蛋白的磷酸化而调节转录。在 *sev* 的控制途径中，MAPK 的靶蛋白已找到，它们是 *sina* 和 *yan*，*sina* 编码一核蛋白，*yan* 编码一 DNA 结合蛋白，它们都含有 MAPK 的磷酸化位点，通过 sina 和 yan 的磷酸化，调节与 R_7 细胞成熟有关的分化基因，使 R_7 细胞发育成熟。

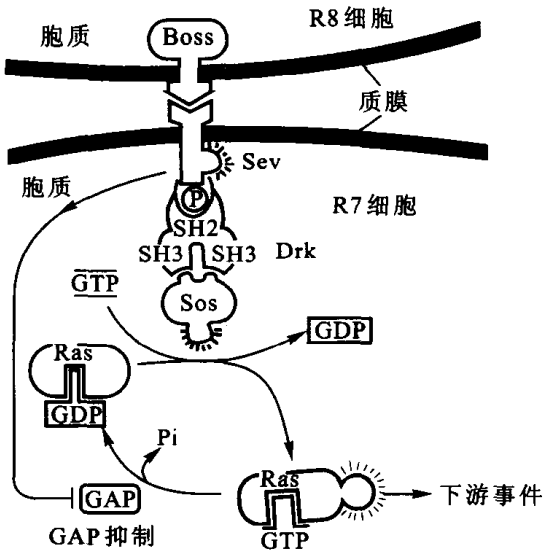


图 9－7　R_7 细胞发育中的信号级联系统

不仅果蝇复眼中 R_7 细胞的发育，近来，还发现秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)雌性外生殖器发育过程中，一些基因分别编码与脊椎动物 EGF、EGF 受体、含有 SH2 及 SH3 结构域的接头蛋白 GRB－2 和 Ras、Raf 的同源物，并以类似于 R_7 细胞发育的信号级联系统参与雌性外生殖器发育

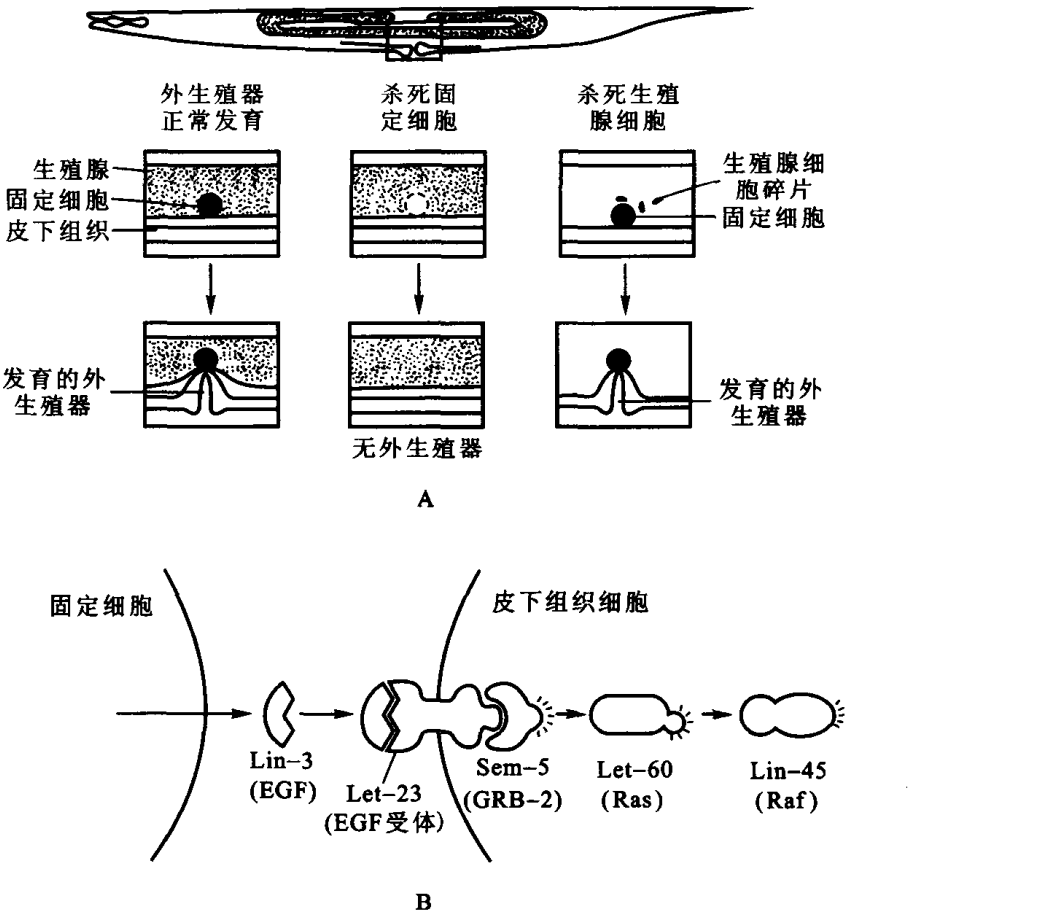


图 9－8　隐杆线虫雌外生殖器的发育及其信号传导途径

A. 隐杆线虫雌外生殖器发育的诱导；B. 隐杆线虫雌外生殖器发育中的信号传导途径

的调节。如图 9－8A、B 所示，隐杆线虫的雌外生殖器由皮下组织发生，其发育过程与生殖腺中的固定细胞的诱导作用分不开。固定细胞的 *Lin* －3 基因编码 EGF 同源物，与皮下组织细胞中的 *Let* －23 基因编码的 EGF 受体相结合，受体膜内区段的酪氨酸发生自身磷酸化。*sem* －5 基因产物与小鼠接头蛋白 GRB－2 有很高的同源性(也是果蝇 Drk 蛋白的同源物)，Sem－5 蛋白可以 SH3 域与 Sos 的 C 端高亲和力相结合，从而介导 Sos 与酪氨酸激酶受体发生偶联，并使信号从 EGF 受体向 Ras 的传导得以实现。*Let* －60 和 *Lin* －45 基因分别编码 Ras 和 Raf 的同源物，使固定细胞发出的信号在皮下组织细胞内发生级联反应，参与雌外生殖器发育的调节，实验证明，上述任何一种基因突变，均可引起雌外生殖器发育的异常。

上述细胞内起始于酪氨酸激酶受体的 Ras 信号传导系统在发育调控中的作用，主要是完成由细胞间相互作用所产生的发育信号(位置信息)的转化，从而将细胞所处的环境与细胞内的基因表达联系起来，诱导细胞分化。同时还表明，不同种动物个体发育过程中，这种信号传导系统具有相似性或保守性，说明信号传导作用在胚胎发育调控中的重要意义。

此外，近年的研究还表明，细胞外基质(extracellular matrix)在胚胎诱导分化中也具有重要作用，相互作用的两种不同类型细胞间可能以细胞外基质使之发生细胞通讯。在相互作用的细胞间存在的糖蛋白复合物，如层粘蛋白(laminin)、纤粘蛋白(fibronectin)及各种类型

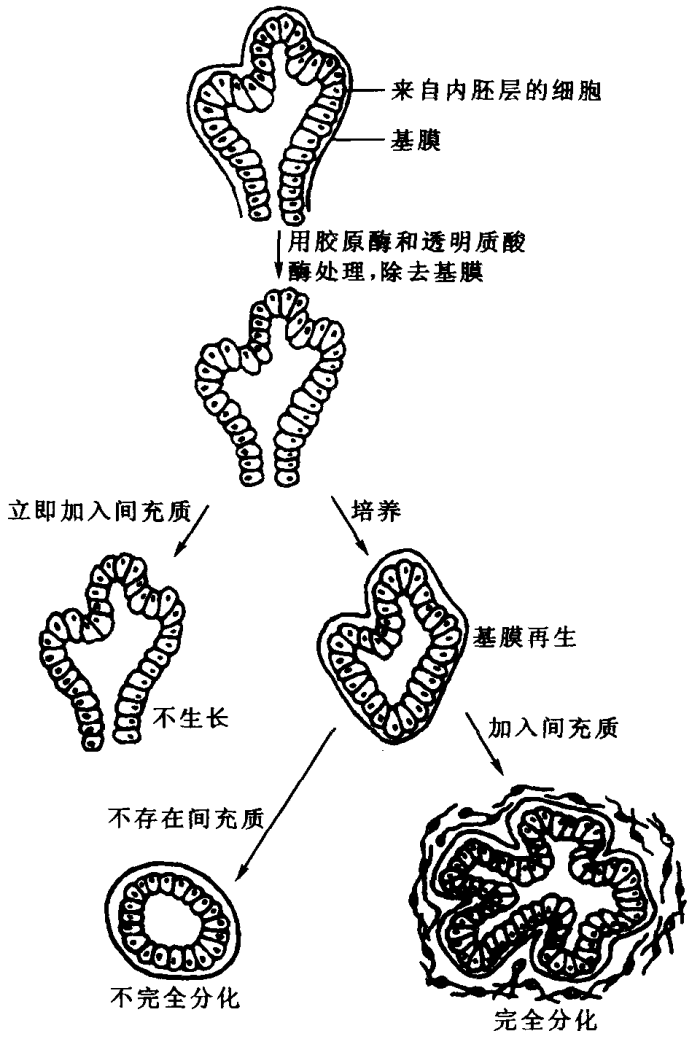


图 9－9 基膜在唾腺分化中的作用(引自 N.K.Wessels)

的胶原纤维,以层粘蛋白为主组成一层清晰的结构,称为基膜(basal lamina)。现已证明基膜对唾液腺的诱导起关键性作用。在发育的腺体中,上皮细胞与一层基膜相接触。上皮细胞在其中生长,最终分化成能分泌的腺体细胞。在基膜下贴附着中胚层细胞,用显微手术将带有基膜的上皮细胞团与中胚层细胞分离。当这种上皮细胞单独培养时,不能进一步生长,但当与间充质细胞混合后便可生长,并连续地分化为唾腺组织(图 9-9)。若将带有基膜的上皮细胞团以透明质酸酶和胶原酶处理破坏基膜后再与间充质的细胞混合,上皮细胞便不能生长与分化,直至基膜再形成时为止。

以上事实表明,对上皮细胞的分化来说,在相互作用系统中有 3 种要素,即两种不同类型细胞和基膜是必要的。其中细胞外基质作为一种化学成分在细胞通讯中可能起某种作用,但其作用机理仍不清楚,是近年来引起人们注意的一个问题。

9.2.3 激素对细胞分化的调节

胚胎发育早期,邻近细胞间的相互作用可诱导细胞分化,这是一种短距离的作用。发育晚期,细胞分化还受到激素的调节。激素由血液循环输送到不同部位影响细胞分化,所以远距离的作用主要依靠激素。

由于激素必须通过细胞的受体才起作用,所以不同激素作用的靶细胞是不同的。根据激素的化学性质可分为多肽和甾类,两类激素通过不同方式作用于细胞,发挥其效应。

多肽类激素如促肾上腺素、促甲状腺素等的受体分布在细胞膜表面,激素与膜表面受体结合后激活与膜相结合的腺苷酸环化酶,使 ATP 转变为 cAMP,提高细胞内 cAMP 水平,cAMP 激活激酶,使靶蛋白磷酸化,产生效应。

甾类激素的受体在细胞质内。由于甾类是脂溶性的,它可通过扩散进入细胞内,与受体结合形成复合物,产生对染色质的亲和性,进入核内与染色质相结合,有选择地激活某些基因转录。

激素对基因活性的作用,常以鸡输卵管合成卵白蛋白及昆虫的蜕皮和变态实验来进行研究。未成熟小鸡的输卵管覆盖着一层未分化的上皮细胞,若给小鸡以雌性激素(oestrogen)慢性逐日注射,开始诱导上皮细胞分裂,经过 4 天,从上皮细胞分化形成管状腺细胞,并开始合成卵白蛋白(ovalbumin);到第 10 天,上皮细胞分化成杯状细胞[合成抗生物素(avidin)]和纤毛细胞(与细胞运动有关);10 天后停止注射雌性激素,卵白蛋白合成便停止,但管状腺细胞仍保留;一旦恢复注射激素,卵白蛋白便又重新合成(图 9-10)。这些变化是在转录水平上调节的,由于染色质模板活力和内源 RNA 聚合酶的增加,核内 RNA 合成便增加,mRNA 的增加出现在大量卵白蛋白合成之前。若雌性激素停止注射,输卵管的 RNA 合成即减退,卵白蛋白 mRNA 逐渐消失;这时若再注射雌性激素,则卵白蛋白 mRNA 在 1 h 内即可产生,卵白蛋白合成量决定于其 mRNA 的水平。雌性激素是甾类激素,其作用原理前已叙述。

昆虫中主要发育变化之一是蜕皮,它在蛹和成虫形成时进行。有关的激素——蜕皮素存在于化蛹前幼虫的前部,如将它切除,剩下的部分就不能发育。注射蜕皮素后,在 24 h 内就能引起化蛹。反映激素对基因表达具调节作用的有力证据,是果蝇和其他双翅目昆虫的唾腺染色体上膨泡(puff)的形成。在幼虫中注射蜕皮素或在培养的唾腺中加入生理浓度的蜕皮素,5～10 min 后即可诱导产生 6 个新的“早期”膨泡,说明原来不转录的基因在蜕皮素

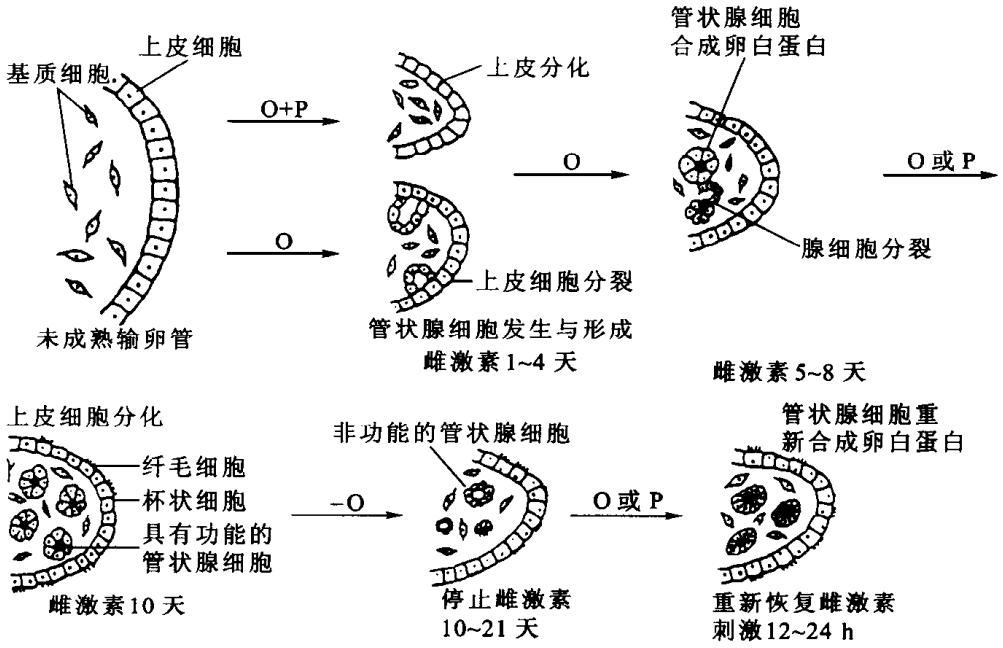


图 9－10 雌激素、孕酮对鸡输卵管管状腺细胞发育和功能的影响

O:雌激素;P:孕酮(引自 T.Oka,等)

作用下转录了。这些"早期"膨泡的产物,有些可能是调节分子,又促进 100 多个"晚期"膨泡的产生,次级地扩大了激素的效应。用实验方法诱发的"早期"和"晚期"膨泡及以后的前蛹期膨泡等,完全反映了果蝇正常发育中膨泡出现的顺序性。蜕皮素是固醇类激素,其作用机理类似哺乳动物的甾类激素,也已找到了相应受体,进入细胞后,蜕皮素－受体复合物也集中到细胞核中,调节某些基因的表达。

9.3 同源盒基因复合物的结构同系物在调节细胞分化中的共性

9.3.1 同源盒序列编码的蛋白质

同源异形基因(homeotic selector genes, *HOM* genes)在控制果蝇体节发育中为表达较晚的一类基因,是最后控制发育为成体果蝇前后各体节形态特征的基因。许多同源异形基因都含有一个很保守的 DNA 片段,这个共同的 DNA 片段称为同源盒(homeobox)。同源盒具有 180 bp,它编码一个含有 60 个氨基酸的蛋白质。此类基因按前后体轴顺序分为两种基因群,分别称为触角足复合物(antennapedia complex, *ANT－C*)和胸腹复合物(bithorax complex, *BX－C*),定位于第 3 号染色体上。*ANT－C* 含有 *labial*(*lab*), *proboscipedia*(*pb*), *deformed*(*Dfd*), *sex combs reduced*(*Scr*)和 *antennapedia*(*Antp*)5 种基因。*BX－C* 含有 *ultrabithorax*(*Ubx*), *abdominal A*(*abdA*)和 *abdominal B*(*AbdB*)3 种基因。这些基因在染色体上的定位顺序与它们沿体轴前后的表达顺序相一致。

目前研究发现,除了果蝇,其他无脊椎动物,如甲虫和螨虫及脊椎动物(如小鼠和人)也

具有同源盒序列。在比较各种动物的同源盒序列所编码的蛋白质氨基酸序列后，发现这些蛋白质氨基酸序列有 60% ～80% 是相同的。尤其令人惊奇的是蛙 *XIHbox2* 基因与果蝇 *Antp* 基因中同源盒序列所编码的 60 个氨基酸中，有 59 个完全相同，仅第 37 位的氨基酸不同(蛙为缬氨酸，果蝇为丙氨酸)，说明这种蛋白质具有很强的保守性。这种保守性在长期的进化中仍保留了下来，表明其生物学意义是很重要的。

这种蛋白质富含碱性氨基酸，第 42 至 50 位氨基酸序列相同的片段富含精氨酸和赖氨酸，这 9 个氨基酸的片段被认为是与 DNA 相结合的区域。现已查明同源盒所编码的蛋白质具有螺旋 - 环 - 螺旋(HLH)结构域，表明 *HOM* 或 *Hox* 基因产物也是可与 DNA 能结合的转录调节因子。说明这种保守的蛋白质可能通过与 DNA 直接结合的方式改变基因表达，从而对胚胎发育进行调控。

9.3.2　*HOM* 基因与 *Hox* 基因间的结构同系物的共同特征

通过分子克隆研究，对人和小鼠已鉴定出 4 类具有同源盒序列的基因，统称为 *Hox* 复合物(*Hox complex*，*Hox* - *C*)，在小鼠，命名为 *Hox a*、*Hox b*、*Hox c* 和 *Hox d*，在人类命名为 *Hox A*、*Hox B*、*Hox C* 和 *Hox D*。这些基因在染色体上的前后排列顺序相应于早期胚胎体轴的头尾顺序，这种特征与果蝇的 *HOM* 基因极其相似(图 9 - 11)。根据基因表达模式和基因表达产物同源区氨基酸序列的相似性，可定出 *HOM* 基因与 *Hox* 基因间的结构同系物(同源基因)，即 *HOM* 基因的 *lab*、*pb*、*Dfd* 和 *AbdB* 分别为 *Hox* 基因的 1、2、4 和 9 的结构同系物，*HOM* 基因的 *Scr*、*Antp*、*Ubx* 和 *abdA* 分别为 *Hox* 基因的 5、6、7 和 8 的结构同系物。

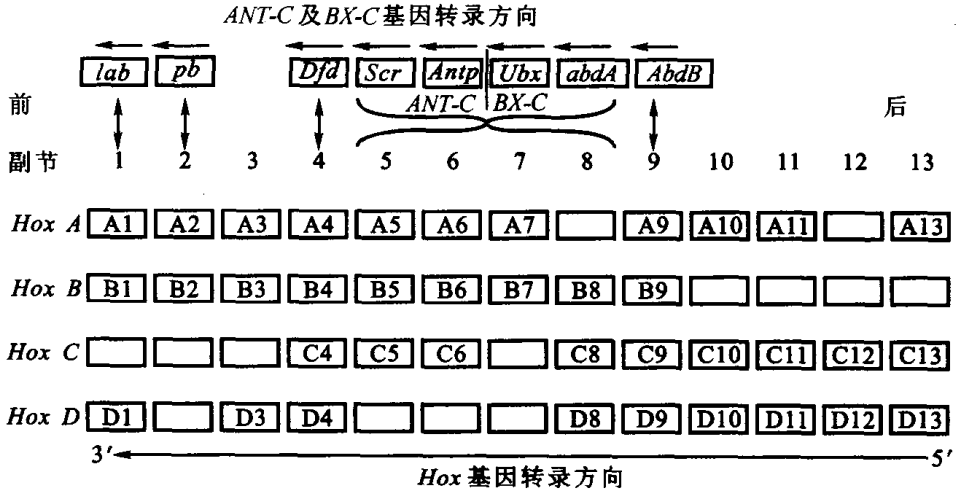


图 9 - 11　人类 *Hox* 复合物与果蝇 *HOM* 复合物的比较

空白方框表示基因尚未鉴定出，不同 *Hox* 基因族中的相应同源基因构成一个平行组，*Hox* 基因包括 13 个平行组，分别含有 2～4 个基因，由 3′至 5′依次用数字 1～13 表示

小鼠 *Hox a* 1 和 *Hox a* 3 基因控制鼠胚胎前区一些结构的正常发育，若 *Hox a* 3 突变，将导致包括内耳和外耳骨骼变形及缺乏胸腺在内的头和颈部的畸变，这种畸变类似于人类的 Di - George 氏综合症先天性疾病，因此，*HOM* 和 *Hox* 基因的研究有可能为阐明某些人

类新生儿发育不健全的疾病带来希望。

小鼠 *Hox b* 4 基因控制第 2 颈椎的正常发育，若 *Hox b* 4 突变导致第 2 颈椎形态变成第 1 颈椎形态结构的同源异形突变，如图 9－12 所示，*Hox b* 4 突变小鼠的第 2 颈椎也具有第 1 颈椎的椎弓和腹隆起的结构特征。与果蝇同样，若某一基因突变，就会引起该基因控制的成体结构形态向相邻的前部成体结构形态转变，说明小鼠 *Hox* 基因在调节前后体轴结构的发育中，具有与果蝇 *HOM* 基因非常相似的调控模式。

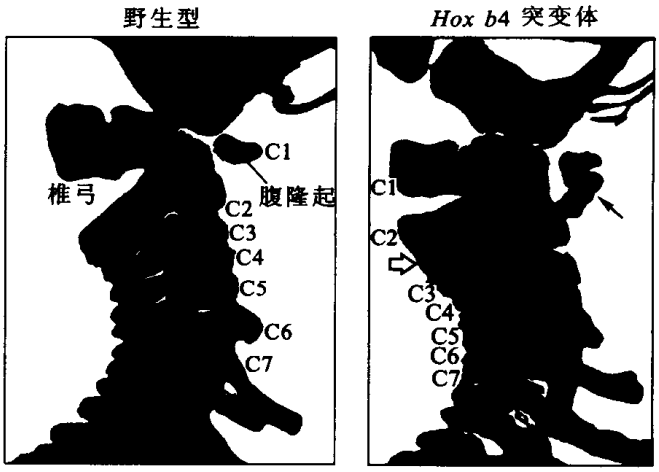


图 9－12 *Hox b* 4 基因突变对小鼠胚胎骨骼发育的影响
空箭头示椎弓，实箭头示腹隆起。C：颈椎

哺乳动物 *Hox C* 基因与果蝇 *HOM－C* 基因的结构同系物，不仅在其蛋白的同源区 60 个氨基酸序列上具有高度的同源性，而且在胚胎发育中，在前后体轴上的表达和调节部位及其功能上也具有惊人的相似性。如果蝇 Antp 蛋白同源区 60 个氨基酸序列与小鼠 *Hox b* 6 蛋白相比，仅有 4 个氨基酸的差别，若将 *Hox b* 6 DNA 片段转入发育中的果蝇细胞核中，结果由于 *Hox b* 6 的表达引起果蝇成虫的触角转变成胸腿，与 *Antp* 突变造成的同源异形突变非常相似。*HOM* 基因和 *Hox* 基因产物的同源区具有与 DNA 结合能力，Antp 蛋白与 *Hox b* 6 蛋白同源区氨基酸序列的同源性很高，表明这两种蛋白对其他基因调控区可能有相同的结合位点。但同源区以外其他区域氨基酸序列的差别很大，这可能是 *Hox b* 6 表达后造成类似 *Antp* 突变的一个原因。由于所产生的突变特征与 *Antp* 突变非常相似，表明 *Hox b* 6 在胚胎前后体轴上的表达、调节部位及其功能类似于 *Antp*，说明 *Hox b* 6 与 *Antp* 是一对结构同系物（图 9－11、9－13）。同样，Hox D 4 与 Dfd 这对结构同系物也有类似情况，若将人 *Hox D* 4 DNA 片段转入发育中的果蝇体内，当 *Hox D* 4 表达后，造成果蝇 *Dfd* 突变时所出现的类似变化，即出现复眼下半部缺失等的畸变。从进化的角度考虑，*HOM* 基因与 *Hox* 基因间的结构同系物对胚胎前后体轴结构发育的调控特征如此相似，表明 *HOM* 基因与 *Hox* 基因间的结构同系物分别是由一个共同的祖先基因演变来的。尽管果蝇和小鼠及人类在若干亿年前在进化道路上早已分道扬镳，但在胚胎发育中，在体节结构分化这类空间信息调控的基因活动中，仍保留着某种相似的基本调控模式。

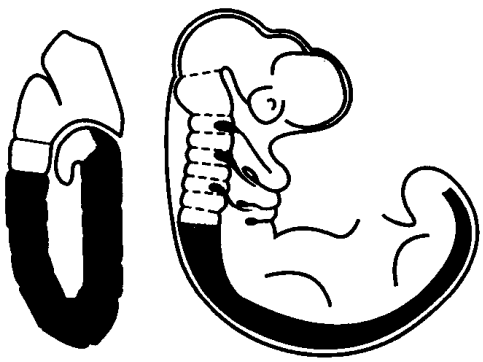


图 9－13 同源异形基因特异地沿动物体轴定位
左图：*Antp* 基因在果蝇胚胎中的表达部位；右图：*Antp* 基因的结构同系物 *Hox b* 6 基因在小鼠胚胎的表达部位。两者比较后，可见它们都定位在胚胎的后部

9.4 细胞分化与动物组织的维持

在成体脊椎动物中，一些组织如皮肤、血液及小肠上皮组织的细胞寿命较短，需要有新生细胞不断代替死亡细胞，在细胞更新过程中，仍然存在像早期胚胎时干细胞（未分化细胞）的增殖和分化，其中包括干细胞群体大小的维持，以及分化方向已决定的细胞在完成最终分化前分裂次数的调节等，以保持这些组织总的细胞群体的恒定和各种生理功能。

几乎每种组织都是由许多不同类型的细胞所组成的，它们虽都处在相同的环境中，但彼此仍保留其各自的特征，而且在差不多所有成熟的组织中，细胞连续不断地死亡，由新生的细胞替换，通过细胞的置换和组织更新，使组织结构得以维持。欲达此状况，必需考虑以下 3 种因素：

1. 细胞通讯

每种特化的细胞总是不断地接受从其他细胞发出的如生长因子等信号，以判断其所处环境的变化，相应地调节其细胞增殖和细胞特性。事实上，许多细胞依赖于这种社会信号才得以生存，这种细胞通讯保证了新细胞按要求在何时、何地产生。

2. 选择性的细胞粘着

因为不同细胞类型的细胞在其质膜上具有不同的粘着素（cadherin）和其他粘着分子，它们以亲和结合方式选择性地与同类型的其他细胞发生粘着。但它们也能与一定的其他类型的细胞或特异的细胞外基质成分选择性地贴附。这种粘着的选择性防止了一种组织中不同的细胞类型间发生混乱的关系。

3. 细胞记忆

在胚胎发育过程中产生的信号所引发的基因特异性表达类型，在此后能稳定地一直保持着，那么细胞便能自动地保持其本身的不同特征，并能传给其子代细胞。成纤维细胞分裂产生更多的成纤维细胞，内皮细胞分裂则产生更多的内皮细胞，以此来保持组织中不同细胞类型的异样性。

9.4.1 干细胞增殖与分化

按分化水平，干细胞可分为多能干细胞和专能干细胞。所谓专能干细胞，是它的子细胞分化为单一类型的分化细胞；而多能干细胞可以产生两种以上不同类型的分化细胞。位于表皮基层的干细胞属于专能干细胞，它最终分化成角质化细胞，位于基底层的干细胞和由它分裂的子细胞位于周围，共有 9 个细胞组成柱状细胞群，称为表皮增殖单位（epidermal proliferative unit）。边缘子细胞脱离基底膜后向上迁移，经过棘细胞层和颗粒细胞层，最后形成角质化无核细胞。这层细胞不断死亡、脱落，由新生的细胞不断补充。在人体不同部位皮肤更新速度约为 2～4 周。在迁移过程中，角质化伴随着分化过程。分析不同层细胞的角蛋白成分，发现不同层细胞的角蛋白成分是不同的。说明角蛋白基因是个大家族，细胞在分化过程中选择其家族的不同成员进行表达。是什么机制促使子细胞进入分化状态，目前仍不清楚。有人认为这与是否和基底膜保持接触有关，如分离的成纤维母细胞在体外培养中若保持与培养器基底接触，便保持其增殖状态，若使之脱离，保持悬浮状态，便能促进其分化。虽然这种设想过于简单，但不可否认表皮细胞的分化与是否和基底膜接触具有一定的

关系。

身体不同部位的皮肤基底层细胞分裂速度不同，这决定于角质化细胞层的厚度（细胞数）。如足底部角质化层要比眼睑表皮的厚许多倍，其基底细胞的分裂速度就比较高。总之，基底层细胞分裂速度要与表皮细胞成熟及脱落保持平衡。

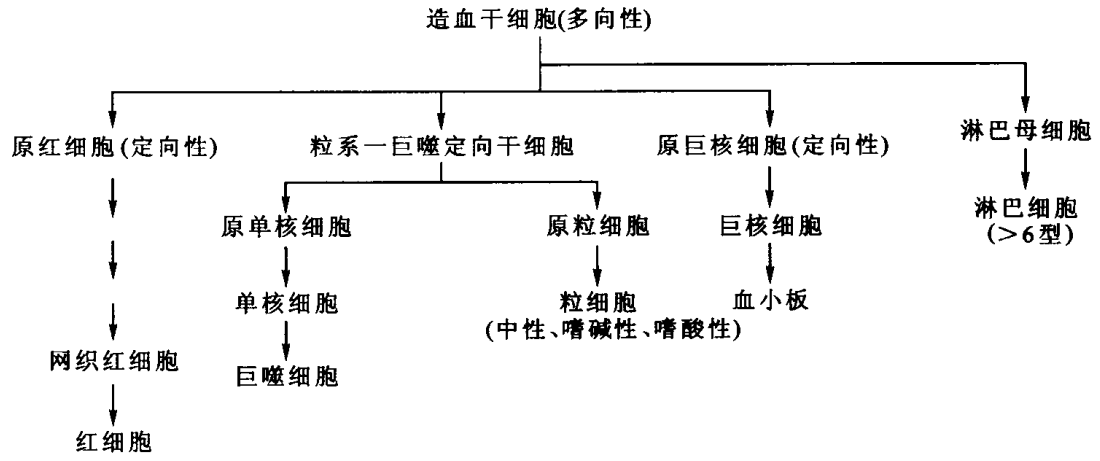


图 9－14 造血干细胞分化示意图

骨髓造血干细胞属于多能干细胞。如图 9－14 所示，它至少产生 12 种类型的血细胞。造血干细胞分化上的多能性，可用脾结节实验证明。将健康小鼠骨髓细胞注入经 γ 或 X 射线处理后的宿主小鼠，2 周后宿主小鼠血液中含有大量供体小鼠的血细胞，并在脾脏表面生长出脾结节。每个结节含有一个细胞克隆，每个细胞克隆均由一个供体造血干细胞繁殖而成，所以，脾结节数与供体小鼠输入的造血干细胞数成正比（图 9－15）。用细胞学方法可以鉴别出每个克隆中所含有的处于分化中的红系与粒系血细胞。由它们再分化成红细胞及各种白细胞，输入周围血液循环。所以，造血干细胞的发育潜能是多能性的。

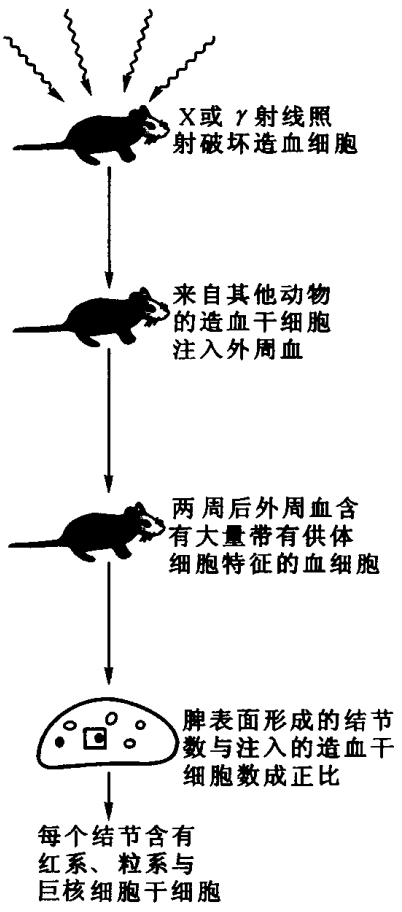


图 9－15 脾结节实验示意图

在造血干细胞的分化过程中，一些特异性蛋白质因子如红细胞生成素、T 细胞生长因子、粒细胞刺激因子等对各系造血干细胞的生长及生长速度起调节作用。这些因子与局部环境的相互作用，对每一种最终分化的血细胞相对数量的调节起重要作用。如在骨髓中，红细胞与白细胞的比例为 1∶1，而在脾脏内为 3∶1，这说明脾脏环境更适合于红细胞生长；但在外周血中其比例却为 1000∶1。当然这还与各种血细胞的寿命不同有关。如红细胞平均寿命为 120 天，而白细胞仅为 1 天左右。

小肠绒毛上皮细胞的更新是从隐窝底部干细胞分裂开始，分裂成的一个子细胞保持增殖能力，回到增殖池，另一

子细胞向上迁移,随着迁移失去增殖能力,分化为上皮细胞,至绒毛顶部死亡脱落,整个过程在小鼠为 3～5 天。

9.4.2 细胞凋亡在胚胎发育及组织维持中的作用

在动物个体发育中,一些细胞将发生死亡,如在秀丽隐杆线虫个体发育中,共产生1 090个体细胞,其中 131 个细胞在发育过程中必定死亡,因此,一个成熟的秀丽隐杆线虫有 959 个细胞。但这种死亡不像细胞坏死,而是一种生理性死亡,是由有关的基因发出信号,作为细胞死亡的指令而发生的。这种死亡在形态、生理特征及生化性质上均不同于细胞坏死,其死亡过程称为凋亡(apoptosis)。

细胞凋亡无论在胚胎发育还是组织的维持中,都具有重要作用。如在个体发育过程中,某些器官组织的退化;细胞有丝分裂和细胞凋亡相互协调以维持正常组织中各种细胞群体的大小;某些类型细胞分化过程中,一些从干细胞分化来的细胞群体不能分化成熟,最终发生细胞凋亡,以此作为细胞类型的选择;在某些器官发生中,部分细胞发生凋亡,使发育器官被"雕凿"成形等等,这些都与细胞凋亡有密切联系。

在胚胎发育过程中,如细胞凋亡在不正常的位置或不恰当的时间发生,或细胞凋亡过度、或不充分,或细胞凋亡时间不正常地延续或提前结束,结果会造成畸胎发生,如可出现短尾或无尾小鼠、缺翅的鸡、人类蹼状指(趾)等畸形。这种畸形的发生往往与环境的影响亦有关,如化学致畸剂、病毒感染或辐射影响等,但环境的影响则要通过细胞凋亡的失控才能造成畸胎的产生。

9.5 细胞分化的机理

细胞中基因并不都是与细胞分化有直接关系的,按其与细胞分化的关系,可将基因分为两类:一类是奢侈基因(luxury gene),与各种分化细胞的特殊性状有直接关系,丧失这些基因对细胞的生存并无直接影响。如表皮的角蛋白,眼晶状体的晶体蛋白(crystallin),红细胞的血红蛋白(hemoglobin)等的基因;另一类是管家基因(house keeping gene),是维持细胞最低限度功能所不可缺少的基因,如组蛋白基因。

细胞分化主要是奢侈基因中某种(或某些)特定基因有选择地表达的结果,导致产生一种类型的分化细胞,而另一种或几种奢侈基因表达的结果出现另一类型的分化细胞。关于细胞中的基因如何有选择地表达的问题,首先是该基因是否存在,其次是它必须能转录成 mRNA,最后由 mRNA 翻译成蛋白质。在研究细胞分化过程中基因表达的调控机制时,必须阐明这种调节是在哪个层次上实现的。

9.5.1 细胞分化与基因组变化

关于细胞分化的原因,有人曾提出,受精卵头几次有丝分裂将受精卵分为背腹两部分分裂球,从遗传学角度来说,这两部分分裂球是不相等的,从而分化成不同类型的细胞。或者是由于细胞中某些基因丢失或永久地失去活性,因而不能表达,而能表达的是没有丢失或仍保持其活性的基因,从而形成不同类型的分化细胞。也就是说,不同类型的分化细胞是由于含有不同的基因或其细胞核的不等能性所造成的。但这些看法已为许多实验否定。

若细胞核经孚尔根染色后测定其 DNA 含量，证明不管来自何种组织的二倍体细胞，其 DNA 含量都是恒定的。有人用小鼠胚胎细胞 DNA 与成体分化细胞 DNA 进行杂交实验，也证明分化细胞基因组的恒定性，说明分化细胞中仍然保留着整套染色体组的全部基因。

Curdon 在这方面做了大量的系统研究工作，他从一种成体蛙皮肤细胞中取出细胞核，移入未受精蛙卵中。这个未受精卵中的核事先用紫外线照射加以破坏，在这种“受精”卵中，有少数可发育至蝌蚪甚至成蛙(图 9－16)。这个实验证明即使已分化的细胞(皮肤细胞)核中仍然保持着整套基因，因此才能分化出成蛙的各种组织细胞，说明细胞分化不是由于基因丢失或永久性地失去活性或发生不可逆的改变所造成的。

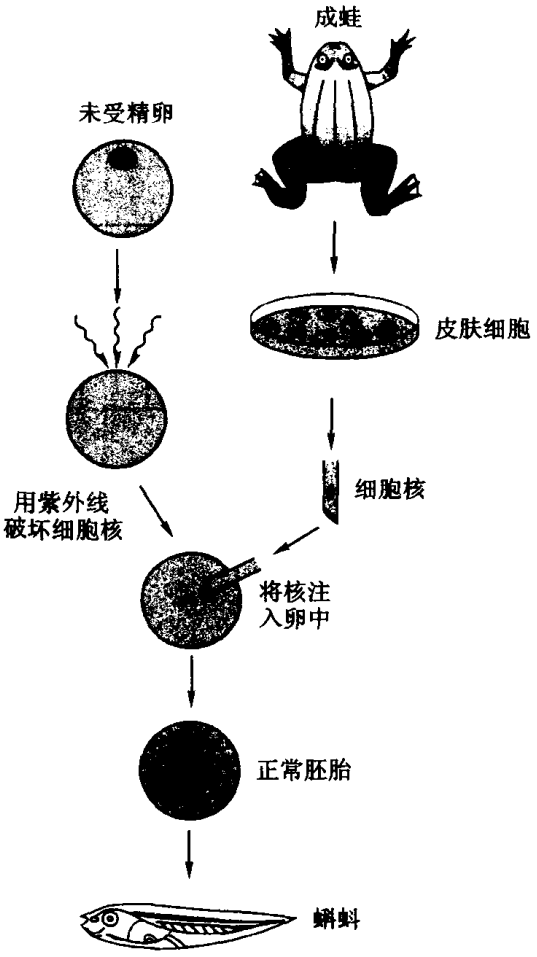


图 9－16 蛙的核移植实验(引自 J.B.Gurdon)

用植物所做的实验也获得了相似的结论，1970 年 Steward 用悬浮培养的胡萝卜单个细胞培养成了可育的胡萝卜植株。尤其是 1997 年有人将羊的乳腺细胞的细胞核移植入去核的羊卵子中，成功地克隆出“多莉”羊，从而进一步证明了即使终末分化细胞，其细胞核同样也具有整套的遗传信息，即具有发育的全能性。

近年来，用胚胎干细胞在体外诱导分化成神经细胞、造血细胞、心肌细胞等的研究报告显示，结合体外基因操作和细胞分化诱导条件选择等综合途径，有可能控制胚胎干细胞导向产生单一类型的功能性分化细胞。这不仅对进一步深入研究细胞分化机理，对人类健康相关的细胞治疗和组织工程都具有很重要的意义。

有些学者认为细胞分化与基因扩增有关。基因扩增现象确实存在，如非洲爪蟾卵母细胞产生 18S、28S rRNA 的 rDNA，与二倍体细胞相比，在成熟过程中扩增了 1 000 倍。另外，在某些昆虫唾腺的多线染色体的膨泡 DNA 复制时也有扩增现象。但这些情况只在生活史的某一段时间暂时出现，并不存在于细胞分化过程中。在昆虫变态中唾腺细胞将要死亡，而卵母细胞中 rDNA 的扩增只表现在卵子成熟期，在受精后和胚胎发育中是不存在的。因此，基因扩增并不是普遍现象。

虽然一些分化细胞的某些基因能编码大量的蛋白质，如网织红细胞的血红蛋白占细胞总蛋白质的 90%。但这并非由于血红蛋白基因扩增的结果，因为用核酸杂交实验证明在红细胞母细胞中，血红蛋白基因并没有扩增，仍然是 4 个基因(2 个基因编码 2 条 α 肽链，另 2 个基因编码 2 条 β 肽链)。这说明当血红蛋白基因充分被激活后，就能产生一个红细胞所需要的全部血红蛋白。因此，基因扩增并不能解释为是细胞分化的原因。

近来发现，B 淋巴细胞在分化过程中编码抗体分子的基因有重排现象。抗体分子是由 2 条重链和 2 条轻链组成，其氨基酸排列序列有两个区域，一个是恒定区(constant region)，

一个是可变区(variable region)。分别由 *C* 基因(constant gene)和 *V* 基因(variable gene)编码。在胚胎发育过程中未分化的 B 淋巴细胞,在 *V* 基因和 *C* 基因间存在一些 DNA 片段将其隔开,而在分化时,由一些酶将部分 *V* 基因片段,非编码的内含子及部分 J 片段(连接片段)切除,再由酶连接起来,组成产生抗体 mRNA 的 DNA 序列。重链和 kappa 轻链都有几百个 *V* 基因片段,因此,可根据选择不同的 *V* 基因片段与 *C* 基因片段组合成多种 DNA 序列,从而产生多种多样的抗体分子,以适应复杂的抗原抗体反应。因而 B 淋巴细胞的分化是由于编码抗体的基因 DNA 序列重排的结果(图 9－17)。

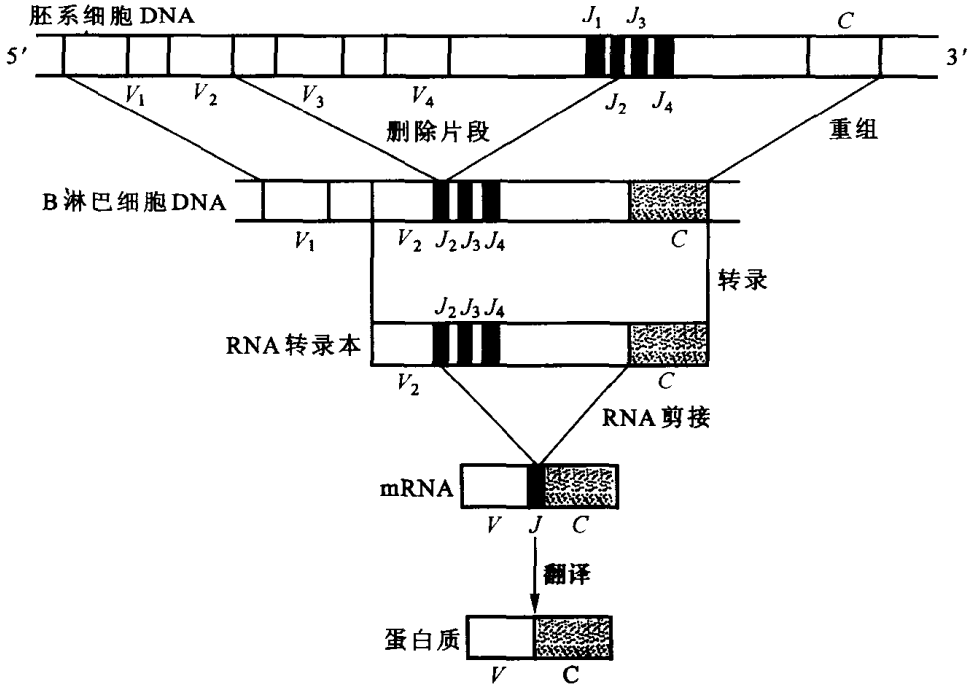


图 9－17　小鼠 B 淋巴细胞分化过程中抗体 kappa 轻链基因 DNA 重排

(引自 S. Tonegawa)

在其他类型细胞的分化中是否也存在基因重排现象？有人对其他一些特异性蛋白如血红蛋白、卵白蛋白基因的 DNA 序列进行内切酶分析。结果表明,不管其组织来源如何,序列都是相同的。同样,从果蝇胚胎及其他组织提取的 DNA 的内切酶酶切片段进行分析,其碱基对序列也无差别。因此,除 B 淋巴细胞外,基因重排在细胞分化中并不是普遍现象,因而尚不能用来解释细胞分化的主要原因。

在研究发育和分化时常以特异性蛋白质的合成及其变化作为观察基因表达变化的一种标志。如随着肌肉细胞的发育可看到,在原肠胚形成时,整个胚胎细胞都能合成肌球蛋白,但原肠期以后,随着器官发生,逐渐分化出有功能的组织时,肌球蛋白的合成便发生变化,合成肌球蛋白的细胞仅局限于心区。这时编码肌球蛋白的基因在心区细胞呈激活状态,而其他部位的细胞则被抑制。在较晚时,随着肌肉收缩纤维的形成,肌肉细胞便加强了肌球蛋白的合成。

从上述事实及其他大量研究资料可以看出,动物细胞表型的差异即细胞的分化,是由于各自表达不同基因的结果。一些胚胎细胞按其遗传潜能来说都是"全能"的,即包含有整套的遗传信息。然而它所携带的遗传信息在发育过程中并不都能表达,而是按严格的时空顺

序,有选择地表达其中一部分。事实上,分化细胞 90% 以上的基因被抑制,而只是有选择地表达其特异的基因,DNA/RNA 分子杂交实验的结果表明基因组的转录只是其中的一小部分,因而,细胞分化事实上是被选定的不同特异性基因表达的结果。

9.5.2 细胞分化与特异性蛋白基因表达的调节

基因表达是通过转录和转录后过程完成的,而转录水平上的调节通常起主要作用。反映基因表达的调节在转录水平上进行的最明显的直接证据,是在果蝇和其他双翅目昆虫的唾腺染色体所看到的膨泡的形成。这种膨泡是基因的活化区,即正在转录 mRNA 的区域。多线染色体上的带是否膨胀成膨泡,即哪些带变膨泡依组织而异,同一种细胞在不同发育时期也有很大变化。如果蝇第 3 号多线染色体左臂,在幼虫期和前蛹期的膨泡的位置是不同的(图 9-18),它清楚地表明在细胞分化过程中,染色体上基因的转录是按一定顺序先后进行的。

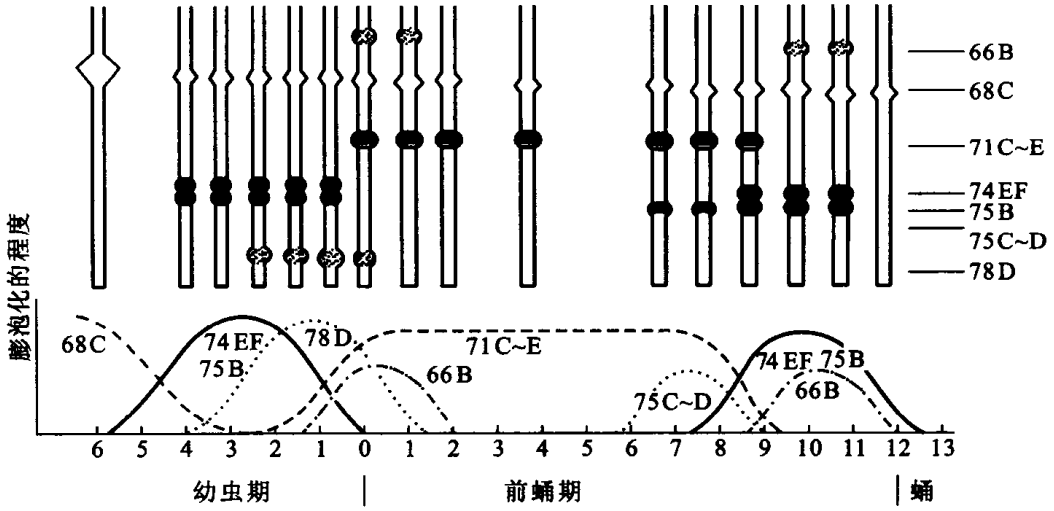


图 9-18 果蝇唾腺多线染色体(第 3 号)左臂上膨泡化(基因活化区)的变化
0 时为蛹化开始时间,数字表示其前后的时间(引自 H.J.Becker)

9.5.2.1 特异性蛋白基因表达的发育阶段特征

许多特异性蛋白基因在发育过程中常表现出时空顺序表达及组织特异性和发育阶段专一性特征。脊椎动物不同发育阶段基因表达的变化研究得较多的是珠蛋白基因(globin gene),所有脊椎动物珠蛋白是由 4 条肽链形成的四聚体。成体动物珠蛋白肽链有两对,一对是 α 链,一对是 β 链,即 $\alpha_2\beta_2$。但在胚胎发生中前后共产生 5 种 β 样(β-like)肽链,β、δ、γ^A、γ^G 及 ε,这些肽链分别由相应的结构基因转录。因此,β 样珠蛋白实际上是个基因家族。这些肽链的氨基酸顺序基本相同,但有差别,如 β 与 δ 间和 β 与 γ^G 间分别有 90% 和 80% 以上的氨基酸顺序是相同的。

随着胚胎发育,珠蛋白四聚体出现的情况有所不同。胚胎型 ε 珠蛋白基因首先在胚胎卵黄囊血岛中表达,随后,ε 珠蛋白基因关闭,主要由胎儿型 γ 珠蛋白基因在胎儿肝脏中表达,到胎儿出生前后,γ 珠蛋白基因表达逐渐下降,同时,成年型 β 珠蛋白基因表达逐渐升高,至出生约 12~18 周后,主要是 β 珠蛋白基因表达,并有少量 γ 和 δ 珠蛋白基因表达。在

哺乳动物早期胚胎中四聚体的组成为 $\alpha_2\varepsilon_2$，然后随着胚胎发育改变为 $\alpha_2\gamma_2$，出生后主要为 $\alpha_2\beta_2$。正常成人的血液中还含有少量珠蛋白 A_2，A_2 由 $\alpha_2\delta_2$ 组成(图 9－19)。

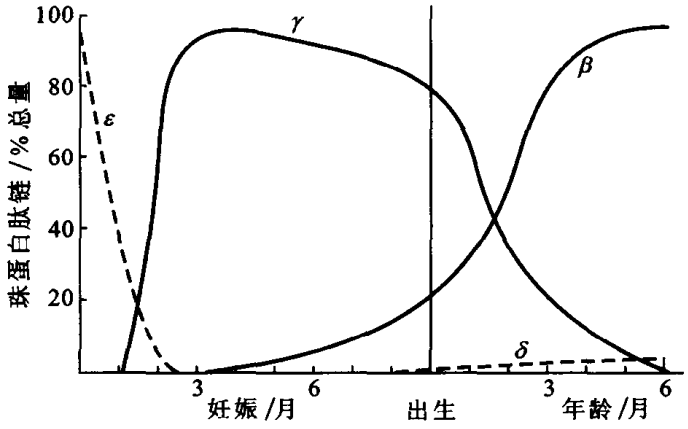


图 9－19　人出生前后红血细胞 β 样珠蛋白基因表达的变化
(引自 W. F. Anderson)

处于决定状态的前体细胞(precursor cell)(即被决定向原成红细胞方向分化的细胞)，尚未产生珠蛋白。若用 ^{32}P－磷酸盐分别掺入前体细胞和原成红细胞，用克隆的胚胎型 β 样珠蛋白基因 DNA 与之杂交，结果只有在原成红细胞中有杂交反应，而前体细胞中的 RNA 不与之杂交。说明前体细胞的胚胎型珠蛋白基因在转录上处于休止状态，直至发育到原成红细胞时其基因才被活化，表明人体 β 样珠蛋白基因表达具有严格的红系组织特异性和发育阶段专一性特点。基因的时空顺序表达是发育生物学中的一个核心问题，而人类 β 样珠蛋白基因家族是一个很好的研究体系。

人类 β 珠蛋白基因家族定位于第 11 号染色体短臂上，主要由 5 个结构基因组成，如图 9－20 所示。ε、γ^G、γ^A、δ 和 β 基因按 5′至 3′方向依次排列，全长约 60 kb，每种珠蛋白结构基

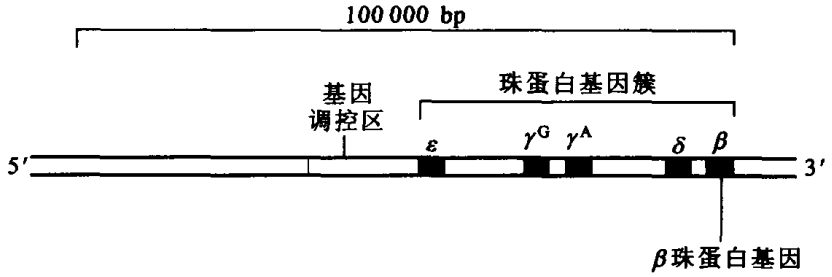


图 9－20　人 β 样珠蛋白基因家族结构图

因均含有 3 个外显子和 2 个内含子。在珠蛋白基因调控区中有一段 DNA 序列，称为座位控制区域(locus control region, LCR)。是位于人 ε 珠蛋白基因 5′上游远侧端 6～21 kb 间的一段 DNA 序列，此区域内含有 4 个 DNase Ⅰ超敏感点(DNase Ⅰ hypersensitive site, HS)，这些 HS 对珠蛋白基因也具有特异性作用。不同哺乳动物 LCR 的 DNA 序列有很强的同源性，且 HS 的空间分布也很保守，说明在进化过程中，不同哺乳动物的 LCR 可能来源于同一祖先，且稳定地存在于红系组织中，是红系组织专一的、层次更高的顺式调控元件，对 β 样珠蛋白

基因转录具有非常重要的调节作用，若 LCR 突变或缺失，甚至部分缺失，就会导致各种贫血症。

如将人 ε、γ 和 β 珠蛋白基因分别与 LCR 连接的重组体 LCR－ε、LCR－γ 和 LCR－β 转入小鼠中，发现 ε 和 γ 珠蛋白基因能正确受到发育控制，即胚胎型 ε 珠蛋白基因仅在早于 13 天的小鼠胚胎造血组织中表达，胎儿型 γ 珠蛋白基因仅在早于 16 天的小鼠胚胎肝中表达，16 天后至成年期基本关闭。但在上述实验中，成年型 β 珠蛋白基因却在整个发育阶段都能表达，丧失了发育时期专一性特征，若在 LCR－β 重组体中将 γ 珠蛋白基因插入，形成类似于体内正常排列次序的 LCR－γ－β 重组体，转入小鼠后，γ 和 β 珠蛋白基因在转基因鼠中能按正确的发育程序表达，显示其发育阶段的特异性。如将 LCR－γ－β 改为 LCR－β－γ 排列顺序的重组体转入小鼠后，发现 β 珠蛋白基因在小鼠胚胎早期卵黄囊细胞中就开始表达，结果又丧失其发育阶段性特征。说明不同珠蛋白基因在染色体上排列的位置，对保持发育阶段的顺序性表达至关重要；同时提示，不同珠蛋白基因的位置与 LCR 相对距离的差异，可能影响不同珠蛋白基因同 LCR 相互作用的频率，从而使近距离珠蛋白基因优先表达，远距离的则在较后阶段被激活，但这种推测尚有待进一步证实。

9.5.2.2 组合调控对特异性蛋白基因表达的调节

组合调控(combinatorial control)是指一组基因调节蛋白共同协调地决定对某一基因表达的调节方式。许多真核基因的调控区中含有正调及负调的基因调节蛋白的结合位点，通过这些结合位点，基因调节蛋白与不同的顺式调控元件发生相互作用，但这种作用必需通过基因调节蛋白间某种特殊的协调作用才能刺激或阻抑特异性蛋白基因的表达。上述 β 珠蛋白基因的表达即受到这种组合调控的调节，图 9－21 显示红细胞发育过程中，一些基因调节蛋白对 β 珠蛋白基因表达的调控模式。其中有些调节蛋白如 CP_1 在多种细胞类型中都存在，而有些如 GATA－1 则是红系组织特异性的，它存在于红细胞的前体细胞中。图中双向箭头表示一些结合位点是 GATA－1 与其他基因调节蛋白所共有的，但当 GATA－1 在这些位点结合后，便排斥其他蛋白的结合。GATA－1 在 β 珠蛋白基因表达的红系细胞特异性方面具有非常重要的作用，因而，在引发细胞分化的各种调节蛋白组合中，往往只有一两种调节蛋白起决定性作用。

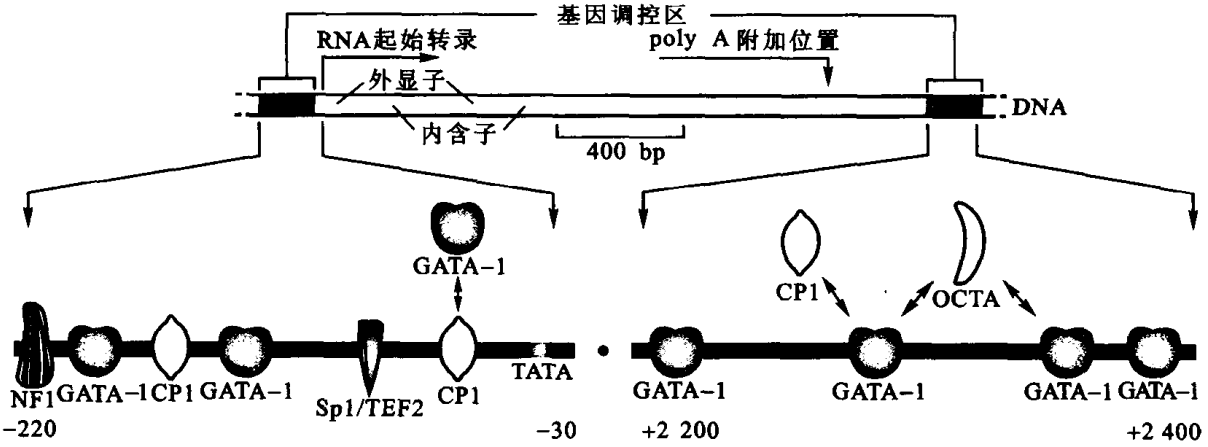


图 9－21 人 β 珠蛋白基因表达的调控模式(引自 B. Emerson)

在组合调控中某种调节蛋白之所以具有决定性的作用，就在于这种蛋白可将不同的调节蛋白完成某种特殊的组合，而这种组合是某种基因的细胞类型特异性表达所必需的。如此，这种起决定性作用的某种基因调节蛋白就有可能启动整个细胞分化过程。这方面最突出的例子是将在肌细胞分化中具有关键性作用的 *MyoD* 基因引入取自鸡胚皮肤的体外培养的成纤维细胞中后，成纤维细胞开始出现成肌细胞的特征，并能融合成多核的肌肉样细胞，能大量表达肌动蛋白和肌球蛋白，组成收缩装置，在质膜上产生受体蛋白及离子通道蛋白，从而能接受来自神经的刺激。但如将 *MyoD* 基因引入非成纤维细胞，这种细胞并不能转变为肌肉样细胞，说明在成纤维细胞中已积累了其他必需的基因调节蛋白，一旦加入 MyoD 蛋白后，便能完成特异的基因调节蛋白的组合，从而启动肌肉细胞的分化，因此，MyoD 在此种组合调控中便成为一种起决定性作用的基因调节蛋白。通过对肌细胞分化的研究，已发现编码肌细胞特异性蛋白的基因调控区中具有包括 MyoD 在内的基因调节蛋白的结合位点，通过这些调节蛋白的组合调控激活这些特异性蛋白基因的转录。

这种调控原则在研究果蝇、小鼠和人眼发育中得到延伸，即组合调控不仅在将一种细胞类型转换成另一种类型中起作用，而且在某一器官的发育中也起调节作用。在眼的发育中，一种关键性基因调节蛋白（果蝇称为 Ey，脊椎动物称为 pax－6）能决定眼的发育。若将 *Ey* 基因人为地引入将要发育成腿的果蝇细胞中，最后，在腿部那些表达 Ey 蛋白的细胞便发育成果蝇眼（图 9－22）。虽然 Ey 蛋白在眼发育过程中，如何协调诱导各种不同类型的细胞分化仍不甚清楚，但 Ey 与一些基因调控区的结合位点相结合后，便能通过组合调控直接调节这些基因的表达。这些基因的表达产物本身又成为其他基因的调节蛋白，这种由 Ey 一种调节蛋白的作用所产生的更多调节蛋白的级联反应，其结果就能形成由多种不同类型细胞构成的具有三维结构的眼器官。

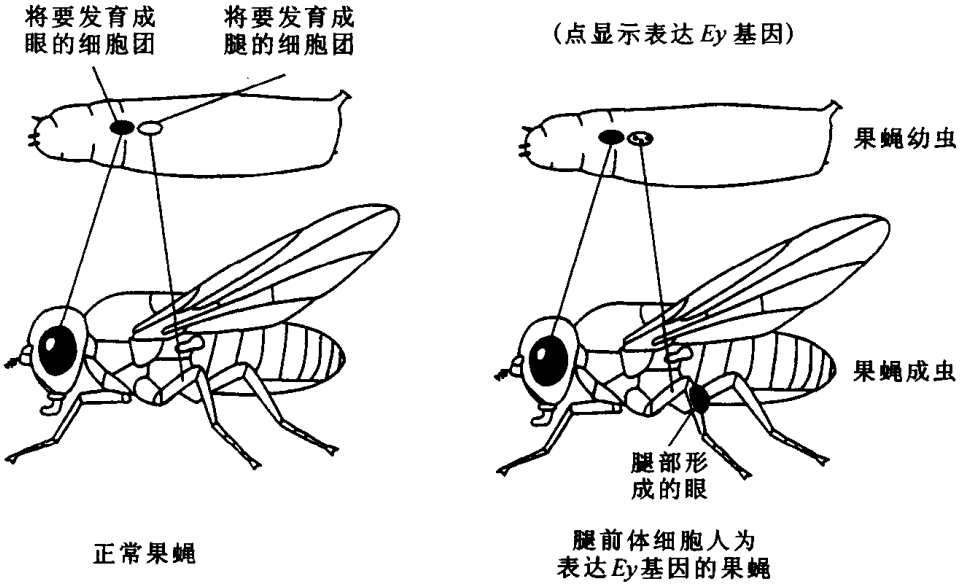


图 9－22　果蝇 *Ey* 基因在将要发育成大腿的前体细胞中表达的结果导致在大腿上发育出果蝇眼

依靠一两种关键性基因调节蛋白，通过特定的调节蛋白的组合引发产生其他调节蛋白

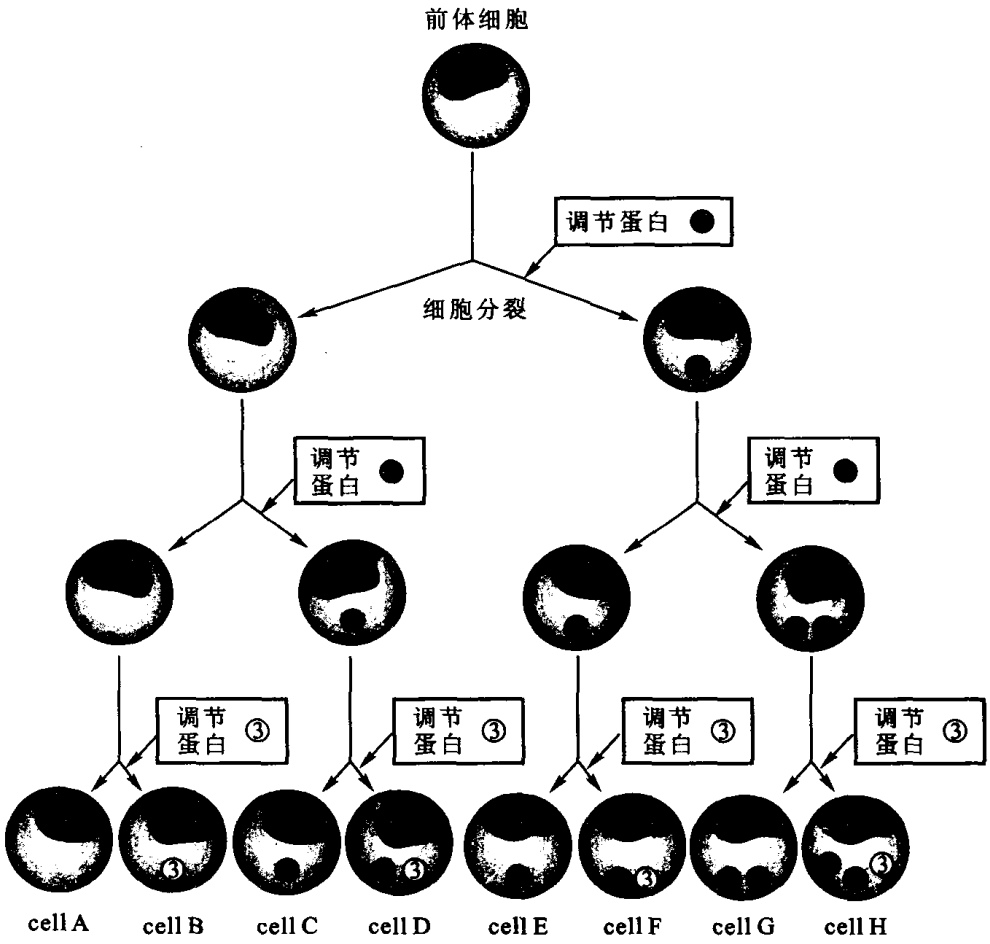


图 9－23 基因组合调控对细胞分化的作用

的级联反应，不断地启动细胞分化。这种原则的反复运用，一点一点地通过形态建成，完成复杂有机体的发育。如此，一个复杂的有机体，虽有多种不同类型的细胞，实际上仅需要相对较少的基因调节蛋白便可启动为数众多的不同细胞类型的分化。其机制就是通过基因调节蛋白的组合调控，而在启动细胞分化的各种调节蛋白的组合中，往往只有一两种调节蛋白起决定性作用。如此，单一基因调节蛋白就有可能启动整个细胞分化过程。图 9－23 示意 3 种基因调节蛋白通过不同的调节蛋白组合可引发 8 种不同类型的细胞分化。对基因调节蛋白组合调控机理的研究必将使细胞分化机制得到逐步阐明，这不仅在理论上、在实践上都具有重大意义。

内 容 提 要

从受精卵发育成人或动物个体是通过细胞生长、分裂、死亡和细胞分化实现的，通过细胞分化产生不同的细胞类型。细胞分化即细胞分裂后，由可塑性状态的同类型细胞在形态、结构和功能上产生稳定性差异，演变为各种特定表型的细胞类型的过程。但在能识别细胞分化前，有一个预先保证细胞怎样变化的时期，这一阶段通称为细胞决定。在这种决定状态

下，细胞具有沿着特定细胞类型分化的能力。当细胞在接受某种指令或信号分子作用后，可将这种作用以某种特定基因的激活或抑制表现出持久不变的稳定状态的方式印记在基因组中，从而产生长时间的细胞记忆，以保证细胞决定的稳定性和遗传性。

基因选择性表达的结果导致细胞分化，那么，特异性蛋白质的合成就可作为研究细胞分化的标志。但各种类型细胞所包含的基因组都是相同的，当细胞分化时，某一类型细胞仅有某些基因被激活，导致各类细胞合成其特有的蛋白质，以执行其不同的功能。激活或抑制基因表达的因子可来自细胞内，如细胞质的异质性对基因的作用；也可来自细胞外，如胚胎诱导所表现的相邻细胞的作用以及激素对细胞分化的调节等。相邻细胞间的相互作用对细胞分化具有十分重要的作用，细胞所处位置不同，对细胞分化的命运有明显的影响，改变细胞所处的位置，可导致细胞分化方向的改变，这种现象称为位置效应。而位置信息即为产生位置效应的主要原因，位置信息实际上是一种信号分子，它可影响细胞分化的方向。位置信息如何在靶细胞内传递并调节与靶细胞成熟有关的分化基因的表达是探明胚胎诱导的核心问题。个体发育晚期，细胞分化还受到激素的调节，不同激素分别与其细胞膜表面及细胞内受体相结合，最终有选择地激活某些基因表达。

HOM 基因与 *Hox* 基因间结构同系物的共同特征表明尽管果蝇和小鼠及人类于若干亿年前在进化道路上早已分道扬镳，但在胚胎发育中，在体节结构分化这类空间信息调控的基因活动中，仍保留某种相似的基本调控模式。

几乎每种组织都是由许多不同类型细胞所组成的，它们虽都处在相同的环境中，但彼此仍保留其各自的特征。在成体脊椎动物中，如皮肤、血液及小肠上皮等组织的细胞寿命较短，需有新生细胞不断代替死亡细胞，在细胞更新过程中，仍然存在像早期胚胎时干细胞（未分化细胞）的增殖和分化，其中包括干细胞群体大小的维持及分化方向已决定的细胞在完成最终分化前分裂次数的调节等，以保持这些组织的细胞群体的恒定和各种生理功能。而这与细胞通讯、选择性细胞粘着及细胞记忆 3 种因素的作用密不可分。

依靠一两种关键性基因调控蛋白，通过特定的调节蛋白的组合调控组织特异性基因的表达，导致细胞分化。这种原则的反复运用，一点一点地通过形态建成，完成复杂有机体的发育。如此，一个复杂的有机体，虽有多种不同类型细胞，实际上仅需相对较少的基因调节蛋白便可启动为数众多的不同细胞类型的分化，其机制就是通过基因调节蛋白的组合调控。

思 考 题

1. 何谓细胞决定？细胞记忆对细胞决定有何作用？
2. 各种不同类型细胞所含有的基因组都是相同的（免疫细胞除外），为何从形态、结构与功能上表现出不同特征？
3. 说明组织特异性基因表达的基本调控机制。
4. 如何从 *HOM* 基因与 *Hox* 基因间的结构同系物的共同特征看动物界胚胎发育的共性？
5. 细胞通讯、选择性细胞粘着及细胞记忆这 3 种因素在组织结构的维持中有何作用？

参 考 资 料

1. 汪堃仁，薛绍白，柳惠图主编. 细胞生物学. 第 2 版. 北京：北京师范大学出版社，1998. 527～603

2. McGinnis, Kuziora M. 躯体设计的分子建筑师. 赵裕卿译. 科学, 1994, 6:22～29
3. 严志江, 钱若竺等. 人体 β 样珠蛋白基因时空表达与调控. 细胞生物学杂志, 1994, 16(4):150～157
4. Alberts B, Bray D, Lewis J, *et al*. Molecular Biology of the Cell. 3rd. ed. New York & London: Garland Publishing, Inc, 1994. 1037～1193
5. Lodish H, Baltimore D, Berk A, *et al*. Molecular Cell Biology. 3rd ed. New York: Scientific American Books, 1995. 543～591
6. Alberts B, Bray D, Johnson A, *et al*. Essential Cell Biology. New York & London: Garland Publishing, Inc, 1998. 267～273, 621～628

第10章

细胞的信号系统

多细胞有机体中，细胞的生长、分裂、分化、甚至死亡都依赖于细胞间精细的通信网络的调控。特别是高等动植物由数以亿计的细胞组成，各种特化的细胞既有着明确的分工又必然要保持相互间的协调，这涉及到信号分子的传递，靶细胞通过受体感受信号，以及胞内对信号的转导，并最终使细胞产生特异性的反应。这是生物体中一种十分复杂又高度有序的重要的生命活动。

10.1 细胞间信号分子传递信号的方式

10.1.1 膜结合信号分子的信号传递

化学信号分子可与细胞内或细胞表面的受体相结合形成复合物，并将受体激活，激活的受体可将外界信号转换成细胞能感知的信号，从而使细胞对外界信号作出相应的反应，这种由细胞外信号转换为细胞内信使的过程称为信号转导(signal transduction)。细胞间信号分子传递方式有多种，膜结合信号的传递是信号分子结合在细胞的质膜上，通过细胞间的直接接触将信号传递给靶细胞(图 10－1A)。与质膜结合信号分子在整个信号分子中所占比例较小，大多数信号分子合成后，由细胞分泌出来，通过传递影响靶细胞的生命活动。但是，膜结合信号分子仍具有其独特的作用，它们与细胞间的识别与粘着相关，相邻细胞通过质膜上的特异性分子而相识，以至于发生粘着。这种细胞的识别与粘着，对于生物的精卵结合，胚胎分化发育，形态发生以及免疫细胞的增殖分化有着重要意义。但由于细胞质膜上结合信号分子与一些胞外分子不易区分，而且将质膜结合分子分离纯化在技术上具有相当大的难度，对于这种类型的信号传递至今了解得还不够深入。

10.1.2 间隙连接中信号分子的信号传递

相邻细胞可通过连接小体构成间隙连接(gap junction)。这种连接方式在动物细胞中是非常普遍的，这种连接使相邻细胞间形成相互连通的孔道，信号分子通过这些孔道在细胞间传递(图 10－1B)。植物细胞则是在相邻细胞间形成胞间连丝，这一结构为细胞间提供了连

接通路，它不仅可让小分子通过，在某些情况下，大分子也可通过。

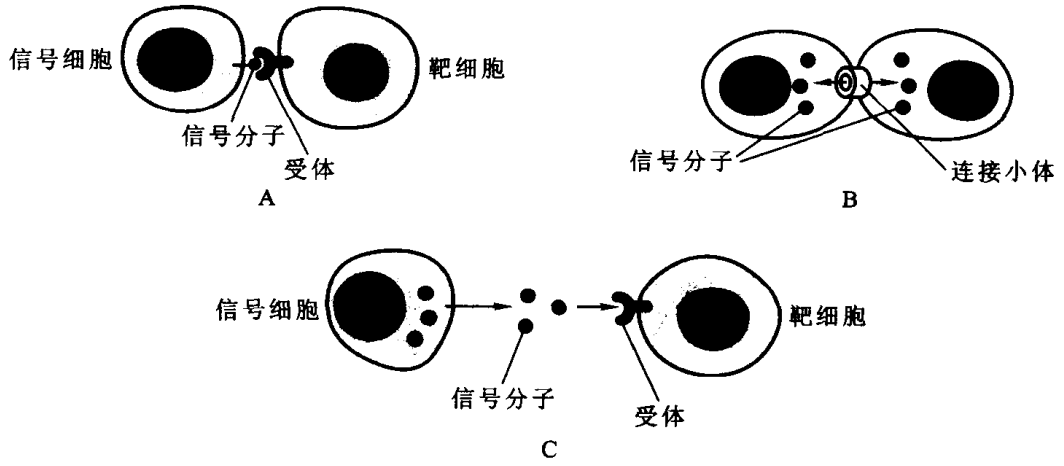


图 10－1 细胞的胞间信号分子传递方式

A. 膜结合信号分子的信号传递；B. 间隙连接中信号分子的信号传递；C. 分泌信号分子的信号传递(引自 B. Alberts, 等)

10.1.3 分泌信号分子的信号传递

信号分子从细胞中分泌出来，经过一定的距离到达靶细胞，这些信号分子称为分泌化学信号，这种信号传递方式是胞间通讯的最主要的途径(图 10－1C)。其中又包括 3 种不同方式：

1. 自分泌信号传递(autocrine signaling)(图 10－2A)，细胞分泌的信号分子结合到自身的受体上引起反应。例如，在发育过程中，一个细胞一旦进入到特定的分化途径，它就可能会产生自分泌信号，确保细胞按照确定的方向分化。一群同类细胞产生的自分泌信号可相互作用，彼此促进，朝着相同方向的分化。这也可用来解释发育早期，常常观察到是一群细胞对诱导分化的信号作出反应，而不单单是一个细胞。此种类型的信号传递也存在于肿瘤细胞的形成与发展中，肿瘤细胞可过高地产生长因子刺激自身，导致增殖失去控制。

2. 旁分泌信号传递(paracrine signaling)(图 10－2B)，信号细胞分泌局部化学递质到细胞外基质中，作为信号分子作用于环境中邻近的细胞。这种局部化学递质，有时由特殊功能的细胞分泌，如浆细胞分泌组胺。身体中大多数组织的细胞都可释放局部化学递质，如前列腺素。对于大的复杂的有机体来说，在进化中产生了一些特殊的细胞，它们在身体各部分间的信号传递中具有特定的作用，这类细胞中最复杂的是神经细胞(又称神经元)，神经细胞长长的轴索可以与较远的靶细胞相连，当一个神经细胞被介质中的信号或其他细胞的信号激活后，沿着它的轴索会发出电脉冲，电脉冲到达神经末稍时，会刺激神经末稍分泌出称为神经递质(neurotransmitter)的化学信号，如乙酰胆碱。神经末稍以一种特殊的方式与靶细胞相连，称为突触信号传递(synapic signaling)，这种连接方式保证了作为信号分子的神经递质能迅速和特异地传递给靶细胞。旁分泌信号只能传递到与信号细胞相邻近的靶细胞，信号分子不能扩散很远。因此它们的信息常常迅速被邻近细胞获取，随后信号分子被胞外基质中的有关酶所分解。

3. 内分泌信号传递(endocrine signaling)(图 10－2C),有机体中还存在着一种信号细胞,即内分泌细胞,它们可分泌出称为激素的信号分子,并进入动物的血液,信号分子随血液到达广泛分布在身体各个部位的靶细胞。

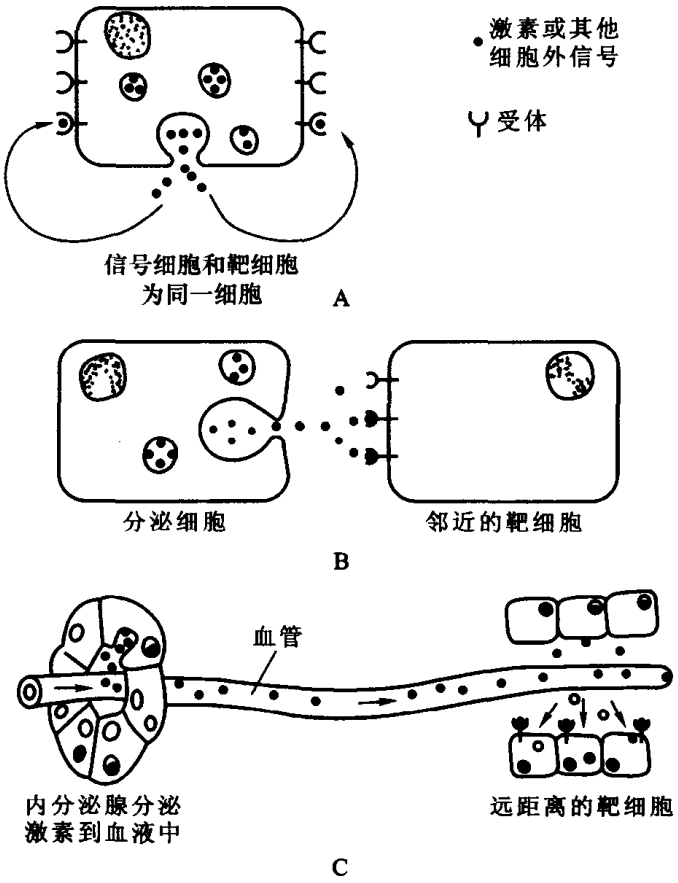


图 10－2　动物细胞中分泌信号分子进行细胞间通讯的 3 种方式

A. 自分泌信号传递; B. 旁分泌信号传递; C. 内分泌信号传递(引自 H. Lodish, 等)

虽然内分泌细胞和神经细胞都参与调控动物体中各类细胞的活动,但是,它们有着不同的特点。内分泌细胞分泌出多种激素,通过血液传递到靶细胞,靶细胞通过膜上或胞内的特异性受体与信号分子结合,由此保证了特异性。在突触信号传递中,特异性决定于神经细胞与靶细胞的特定接触,通常一种神经细胞释放的神经递质只对与它相接触的靶细胞作用(有少数例外)。不同的内分泌细胞常常产生不同的激素,但许多神经细胞却能使用相同的神经递质。

因为内分泌信号传递依赖于扩散和血液流动,其速度相对较慢,与之相比,神经细胞传递信息较为迅速和准确,电脉冲的传播速度可高达 100 m/s,而且神经递质一旦从神经末稍释放出来,扩散不到 100 nm 就到达靶细胞,这一过程不超过 1 ms。内分泌与突触信号传递的另一个差异是激素进入血液或体液后被高倍稀释,所以信号分子能以非常低的浓度发挥作用,神经递质则稀释得很少,它们到达靶细胞时仍有较高的浓度,有的能达到5.0×10^{-4} mol/L,与此相一致的是神经递质受体与配体的亲和力较低,神经递质能迅速从受体上分离

下来,终断信号反应。

10.2 信号分子与靶细胞效应

10.2.1 信号分子类型

按照信号分子的组成与结构,其种类是非常多的,然而,根据其溶解性,信号分子(signal molecule)可分为亲脂性和亲水性两类。亲脂性小分子的主要代表是甾类激素和甲状腺素,它们相对不溶于水,在血液转运过程中与特殊的载体蛋白结合。在血液中停留时间长,如甾类激素为数小时,而甲状腺素为数天,所以它们可以介导较长时间的持续反应。这类分子从血液中载体蛋白释放出来,很容易穿过靶细胞的质膜进入细胞,与细胞质或细胞核中的受体结合,形成配体受体复合物。配体受体复合物通过与 DNA 的特定控制区结合,改变基因表达模式,通常影响特殊组织的生长与分化。

亲水性信号分子包括神经递质、生长因子、细胞因子、局部化学递质和大多数激素,它们不能穿过靶细胞质膜的脂双分子层,仅能与细胞表面上的特殊受体相结合,通过信号转导机制,在细胞内产生第二信使或激活蛋白激酶或蛋白磷酸酶的活性。第二信使很快改变靶细胞中已存在的酶的活性或非酶蛋白的活性,引起细胞对外界信号的反应。蛋白激酶通过蛋白磷酸化级联反应,最后影响基因表达,引起细胞对外界信号的反应。进入血液中的水溶性激素,一般在几分钟内就能被清除或降解。局部化学介质和神经递质则被清除得更快,当它进入到细胞外液中时,几秒或几毫秒内被清除掉,所以水溶性的信号分子介导短暂的反应。

虽然亲脂性的小分子能穿过细胞质膜,但大的亲脂性信号分子不能穿过质膜。它们仅能与细胞表面受体结合,引起细胞反应。例如前列腺素,它是由体内大多数组织产生的一类脂溶性激素的化合物。其前身是细胞中的花生四烯酸和卵磷脂。它是一群含有 20 个碳原子的不饱和的脂肪酸,至少有 16 种以上的不同的前列腺素,前列腺素与其他大多数信号分子不同,它们不被细胞贮存,而是连续地合成并释放到细胞外,在细胞外很快地被酶降解,所以仅能作用于邻近的细胞(旁分泌)。前列腺素可以调节其他激素的反应,对许多细胞的生命活动产生深远的效应。例如一些前列腺素可以启动平滑肌收缩,在婴儿出生时,子宫中产生大量的前列腺素,刺激子宫平滑肌收缩。

此外,气体(如 NO、CO、植物中的乙烯)可作为信号传递者,它们由一个细胞产生,穿透细胞质膜进入其他细胞,做为细胞内信使与其相应受体结合,调节靶细胞的功能。

10.2.2 信号分子具有的特异性

每种信号分子都有其特定的靶细胞,这种特异性是由信号分子与靶细胞中的受体共同决定的。因此对于一种信号分子来说,它能使哪种细胞产生效应是确定的,反过来,一种细胞能接受哪些信号分子的调控也是确定的。例如垂体促甲状腺激素只作用于甲状腺细胞。值得一提的是有些信号分子的靶细胞可能有多种。信号分子本身既不具有酶的活性也不能直接激活基因表达,它通过激活靶细胞中的受体来发挥作用。许多信号分子是以非常低的浓度(通常$\leqslant 10^{-8}$ mol/L),并以非常高的亲和力(亲和系数 $K_a \geqslant 10^8$ mol/L)与其互补的受体相结合。在发育成熟的动物中,大多数的细胞特化,以便完成一种主要的功能。它们通过胞

内或细胞质膜分布的特定受体，保证细胞仅对那些启动或调节细胞特有功能的信号分子作出反应(图 10－3)。

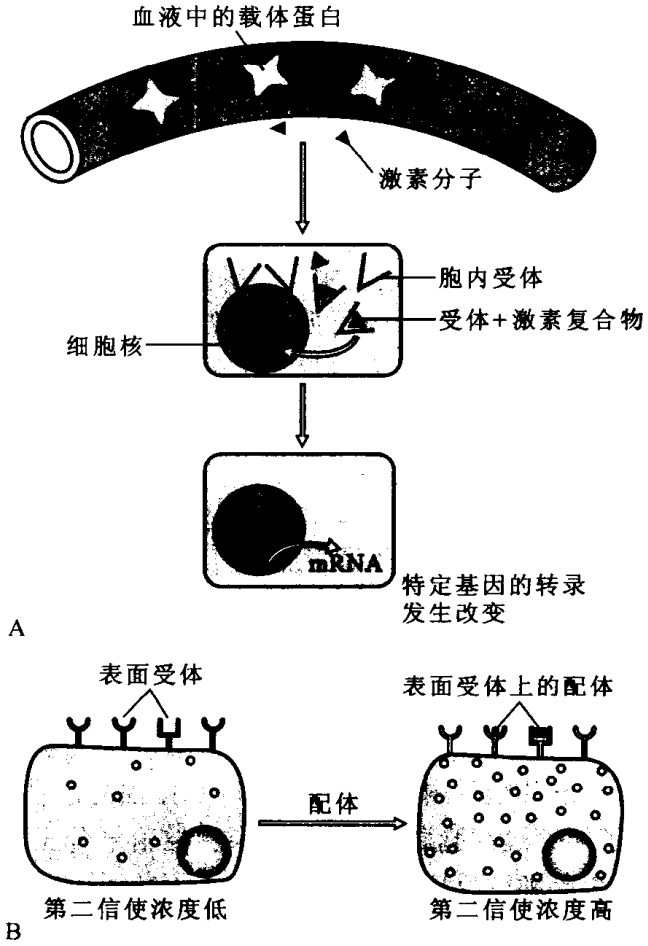


图 10－3　与信号分子结合的受体在细胞中存在的部位

A. 细胞内受体；B. 细胞表面受体(引自 H. Lodish, 等)

10.2.3　每种类型的细胞受到多种信号的调控

在多细胞生物体中，任何一种细胞都会从所处的环境中接触到很多种不同的信号分子，这些信号或呈溶解状态，或结合在邻近细胞表面，以多种方式发挥作用。细胞根据自身的特点对各种信号作出相应的反应，并通过对一系列信号的反应决定细胞的命运，细胞或增殖、或分化、或产生某些特定功能。

大多数高等动物细胞都通过一种机制对特定信号作出反应，以维护细胞的正常生存。不同种类的细胞需要不同的生存信号，这样，特定的细胞就只能生活在身体的特定部位。细胞通常接受的不是单一的信号而是特定组合的多种信号，细胞表现出的效应是多种信号的综合效应。这样，一种动物就能利用种类不太多的信号分子，通过大量不同的组合产生各种各样的效应，并以此方式高度特异地控制其各种细胞行为。

10.2.4 不同细胞对相同信号的反应各异

细胞对其环境作出反应的方式是多种多样的，它们通过接受特定组合的信息而作出反应，这样，同一种信号分子常常对不同的靶细胞产生不同的作用。例如，作为神经递质的乙酰胆碱刺激骨骼肌细胞收缩，但却使心肌细胞的收缩速率和收缩力度下降，其原因是由于骨骼肌细胞上乙酰胆碱的受体与心肌细胞的不同。但受体的差异不能解释所有效应差异。在有些情况下，相同的信号分子结合到同种受体上却由于靶细胞种类的不同而产生不同的反应，如一些分泌细胞上的乙酰胆碱受体与心肌细胞的相同，但它们的作用是导致细胞分泌，这反映出不同细胞对同一信号作出反应的机制是不同的(图 10－4)。以上例子表明，不同细胞对相同信号可作出不同的反应，它们有的属于受体种类的差异，也有的是由于同一种类受体激活不同的信号通路。

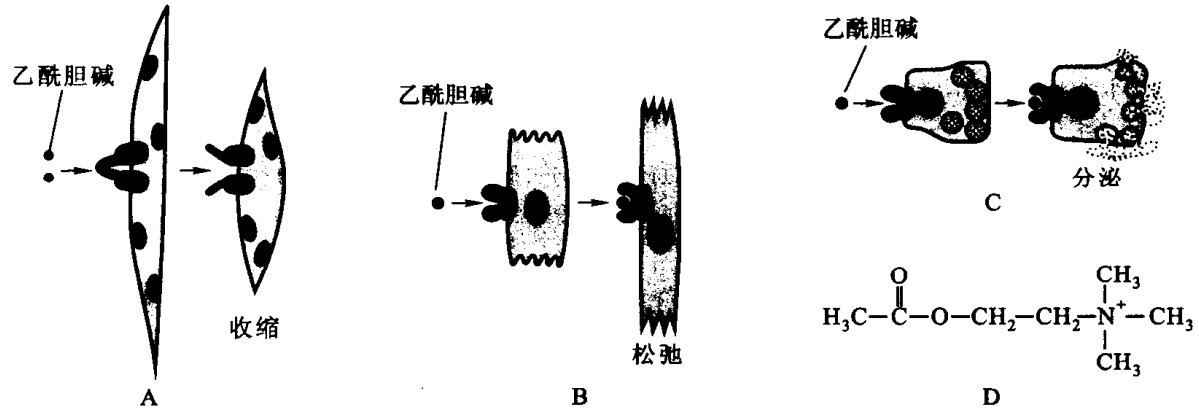


图 10－4 相同信号分子在不同细胞中诱导不同的反应

A. 骨骼肌细胞；B. 心肌细胞；C. 分泌细胞；D. 乙酰胆碱结构式(引自 B. Alberts, 等)

10.3 蛋白质的可逆磷酸化与信号传递

蛋白质磷酸化作用很早就已被发现，但蛋白磷酸化可作为生物体的一种代谢调节机制是在 20 世纪 50 年代被确定的。目前估计人类细胞中有多达 2 000 个左右蛋白激酶基因和 1 000个左右蛋白磷酸酶基因，蛋白激酶和蛋白磷酸酶催化蛋白质的磷酸化和去磷酸化反应。

磷酸化反应是泛指磷酸基团通过酶促反应转移到其他化合物的过程，如 NAD 转化成 NADP。蛋白质的磷酸化则是指由蛋白激酶催化的把 ATP 或 GTP 的磷酸基转移到底物蛋白质氨基酸残基上的过程，其逆转过程是由蛋白磷酸酶催化的，称为蛋白质去磷酸化。

受体接受信号后，需通过胞内信号蛋白传递到胞核，改变基因的表达方式，进而改变细胞的状态。胞内信号蛋白组成了一个精细的调控系统，当信号传来时，系统中的成员将逐级地被磷酸化或去磷酸化，而蛋白的磷酸化与去磷酸化又直接影响着它们的活性，这样通过将信号蛋白逐级激活而使信号迅速传递。蛋白磷酸化通常有两种方式，一种是在蛋白激酶催化下直接连接上磷酸基团，另一种是被诱导与 GTP 结合，这两种方式都使得信号蛋白结合

上一个或多个磷酸基因，被磷酸化的蛋白有了活性后，通常反过来引起磷酸通路中的下游蛋白磷酸化，当信号消失时，信号蛋白就会去磷酸化(图 10－5)。

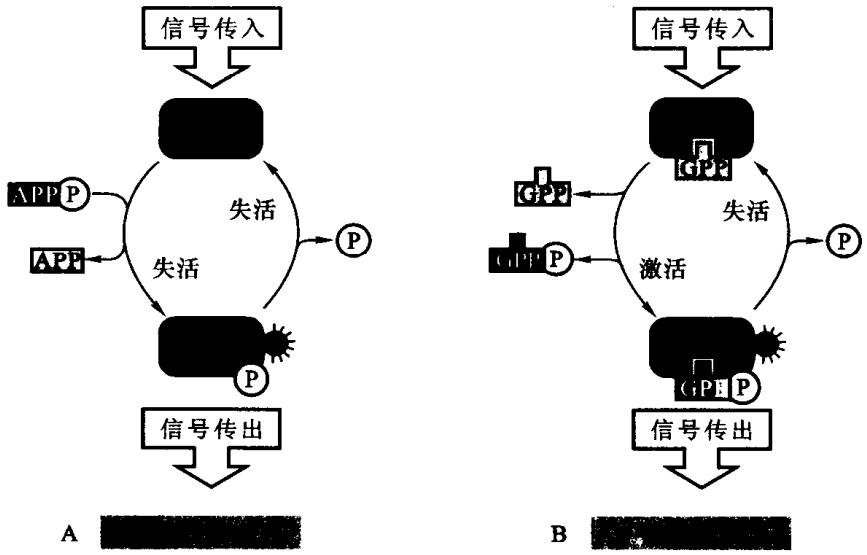


图 10－5　胞内信号转导蛋白通过磷酸化与去磷酸化调控活性的两种方式

A. 通过磷酸化传递信号；B. 通过 GTP 结合蛋白传递信号(引自 B. Alberts, 等)

磷酸化通路通常是由两种主要的蛋白激酶介导的，一种是丝氨酸/苏氨酸激酶，另一种是酪氨酸蛋白激酶，在一个哺乳动物细胞中约含 100 多种这样的酶，其中大多数是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，不过酪氨酸蛋白激酶在酶连受体的信号传递中具有关键性作用。现已知细胞的命运不是由单一信号而是由多种信号作用的综合效应来决定的。细胞接受来自不同信号的信息，产生综合反应，由此决定细胞是生存还是死亡，是增殖还是休眠，这种综合反应依赖于不同胞外信号激活的各种蛋白磷酸化通路之间的相互作用。

蛋白激酶和蛋白磷酸酶通过将一些酶类或蛋白磷酸化与去磷酸化，控制着它们的活性，使细胞对外界信号作出相应的反应。与信号传递有关的蛋白激酶主要受控于胞内信使(cAMP、Ca^{2+}、DG 等)，这种共价修饰的调节方式显然比变构调节较少受胞内代谢产物的影响，能比较专一地催化与外界刺激有关的生化反应，使细胞对这些胞外信号作出准确的应答。此外，蛋白质磷酸化在信号传递中一个最重要的特点是对外界信号具有级联放大作用，因为它是以酶调节反应为基础的。胞外即使有很微弱的信号也可以通过一系列连锁反应得到充分的放大。

10.4　胞内受体介导的信号传递

在各类信号分子中，有些与胞内受体相结合，而有些与细胞表面受体相结合。与胞内受体结合的信号分子首先要穿越细胞膜进入胞内，所以它们通常是小的疏水性分子，主要种类有甾类激素、甲状腺激素、维甲酸、维生素 D，它们在化学结构上和功能上都有很大差别，然而它们都以相似的机制发挥作用，即直接穿过靶细胞质膜并结合到胞内受体蛋白上，形成配体—受体复合物，将受体激活，然后直接调控特定基因的转录。

胞内受体在结构上具有相同的特点，组成了胞内受体超家族（intracellular receptor superfamily）（图 10－6）。受体与抑制蛋白复合物结合时处于无活性状态，当配体与受体结合成复合物后，引起抑制复合物解离，受体结合 DNA 的部位显露出来，受体由此被激活。胞内受体在结构上都具有短的 DNA 结合区域，它们通常以同源二聚体或异源二聚体的形式与 DNA 结合。

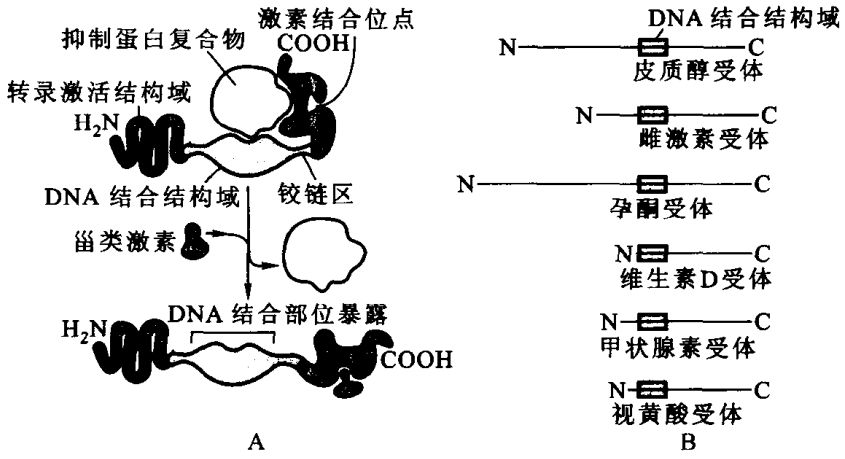


图 10－6 胞内受体超家族

A. 胞内受体蛋白模型；B. 几种胞内受体超家族成员（引自 B. Alberts, 等）

一个典型的靶细胞约有 10 000 个甾类激素受体（steroid hormone receptor），每个受体与专一甾类激素可逆地高亲和力地结合，用氚标记雌二醇进行的研究，发现甾类受体存在于细胞质中，与甾类信号分子结合后被激活，分子构象发生变化，通过核孔进入细胞核，并与相应基因的调控区相结合，调控基因的表达。随后的研究发现，不仅有雌性激素结合的受体出现在胞核中，有些未结合信号分子的受体也存在于细胞核中，因此，可能有的甾类受体未结合配体前存在于细胞质中，而另一些则存在于细胞核中，并且以后一种为主。类固醇、甲状腺激素、维甲酸、维生素 D 等的胞内受体可结合到相应基因附近的特定 DNA 序列上，调控这些基因的表达，某些受体如皮质醇受体最初定位于胞质，当配体结合后，便可进入细胞核与 DNA 结合，其他的受体如维甲酸受体最初定位于核中，在配体缺乏时与 DNA 相结合，在这种情况中，配体结合可改变受体蛋白的构象，然后是激活或抑制基因表达。在许多情况下，甾类受体调节的基因活化反应包括两步（图 10－7）。首先是直接诱导少量基因的转录，即原初反应（primary response），接着是这些基因产物反过来激活其他基因转录，产生一个次级反应（secondary response），这样一种简单的激素诱导因子就能在基因表达的模式上引起非常复杂的变化。例如，果蝇在注射昆虫蜕皮激素后仅 5～10 min，其唾腺的巨大染色体上出现 6 个主要的 RNA 新合成部位（膨松区），再过一定时间后，由初级反应产生的一些蛋白又进一步诱导出 100 个左右 RNA 合成部位，产生大量次级反应外，还有一部分具有反馈调控的作用，抑制了初级反应基因的进一步转录。抑制蛋白质合成的药物可抑制次级反应中基因的转录，但不抑制原初反应中的基因的转录。在激素诱发的许多哺乳类动物细胞的基因转录中，都存在着类似的扩增和调控机制。

目前已从克隆出的 cDNA 反推出多种甾类激素受体的氨基酸顺序，尽管各种受体所含氨基酸数量不等，但都具有一个高度保守的富含半胱氨酸的区域，它由 70～80 个氨基酸组

成两个锌指结构。如果将不同的甾类受体的保守区对齐排列,发现它们 C 端氨基酸长度相似,并具有相当的保守性,而 N 端氨基酸长度各不相同,且保守性差。现已知甾类受体有 3 个功能区:DNA 结合区(C 区);激素结合区(E 区)和受体调节区(A/B 区)。受体调节区具有一个转录激活结构,决定启动子专一性和细胞专一性。E 区除激素结构域外,还有转录激活、受体二聚化及抑制蛋白结合的结构域,由于 E 区缺失的受体有不依赖于激素的转录活性,推测它对 DNA 结合区(C 区)有遮盖作用。受体的抑制蛋白(热休克蛋白)结合到 C 区上,阻碍了受体与 DNA 结合,激素的结合改变了受体的构象,使抑制蛋白解离下来,受体 DNA 结合区暴露从而被活化。

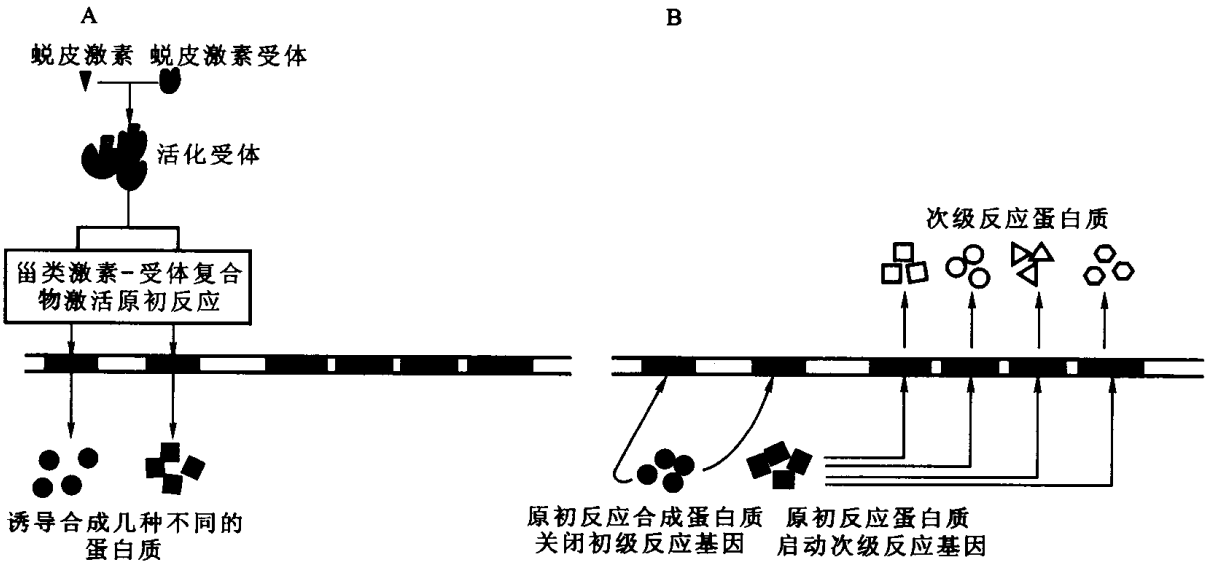


图 10-7 甾类激素诱导的基因转录包括的两步反应

A. 甾类激素的原初反应; B. 甾类激素的次级反应(引自 B. Alberts, 等)

10.5 细胞表面受体介导的信号传递

所有水溶性信号分子,包括神经递质、激素蛋白、生长因子,以及某些脂溶性信号分子都是结合到靶细胞表面特定受体蛋白上,对细胞产生影响,这些细胞表面受体蛋白,作为信号的转导因子,能以高亲和力与信号配体结合,并将这种胞外作用转化成一种或多种胞内信号。根据信号转导机制和受体蛋白的性质,细胞表面受体主要分 3 种类型。

10.5.1 连接离子通道受体的信号传递

离子连接通道受体(ion - channel - linked receptor)与电兴奋细胞之间快速突触信号转导有关,它们是一种多次跨膜的蛋白,本身就是离子通道的组成蛋白。在神经细胞的突触连接中,当少量神经递质与受体结合时,可瞬间打开或关闭离子通道,由此迅速改变质膜对离子的通透性,最终使突触后细胞兴奋性发生变化(图 10-8)。

烟碱型乙酰胆碱受体(nAchR)是此类受体中研究得比较清楚的一种,它是神经突触后

膜上的整合蛋白，是由 α，β，γ，δ 4 种亚基组成的五聚体（α2βγδ），各亚基呈环行排列，中间为受体的 Na^+ 通道区。总的来说，目前对此类受体了解得还比较少，加之其分布的细胞种类不多，本节中不重点介绍。

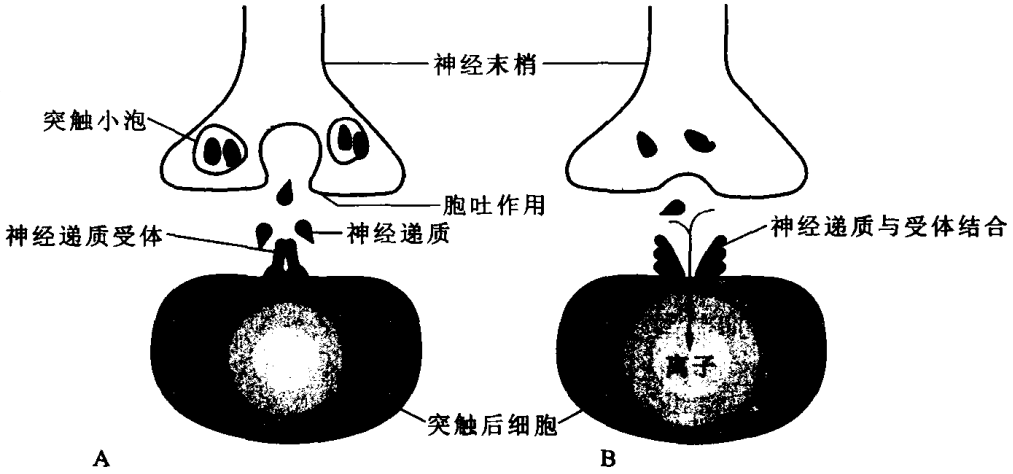


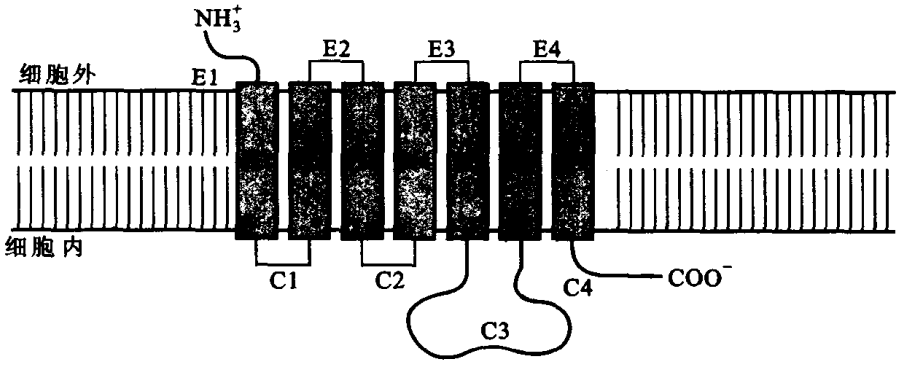
图 10－8 突触连接中突触后膜上的连接离子通道受体受神经递质的作用

A. 神经末梢活化释放神经递质；B. 神经递质与受体结合打开离子通道

10.5.2 连接 G 蛋白受体的信号传递

10.5.2.1 连接 G 蛋白受体

连接 G 蛋白受体（G－protein-linked receptor）为一条跨越质膜 7 次的多肽链表面受体（图 10－9），其 N 端位于细胞外，C 端位于细胞内，跨膜的肽链为 α 螺旋，受体位于胞外的区域，负责与配体结合，与异三聚体 G 蛋白结合的区域以及磷酸化位点位于胞内。这类受体通过间接作用调节一种与其分离的膜结合靶蛋白，这些靶蛋白可能是一种酶，也可能是一种离子通道，受体对靶蛋白的作用是由一种特定的蛋白介导的，这种蛋白称为异三聚体 GTP



E1～E4：胞外环

H1～H7：跨膜α螺旋

C1～C4：胞内环

图 10－9 连接 G 蛋白的受体结构模型（引自 H. Lodish，等）

结合蛋白(简称 G 蛋白,其组成与特性在下节中介绍),当配体与受体结合后可改变受体构象,使之与质膜内侧的 G 蛋白结合,共同活化靶蛋白。如果靶蛋白是一种酶,由 G 蛋白激活后,可调控一种或多种胞内介导因子(intracellular mediators)的活性,如果靶蛋白是离子通道,激活后可改变质膜对离子的通透性。

连接 G 蛋白受体是一个很大的细胞表面受体家族,在哺乳动物细胞中已发现 100 个多个成员,通过此类受体介导产生反应的信号分子有许多种类,它们包括激素、神经递质、局部介导因子,这些信号分子在结构上、功能上都是各不相同的,其中有蛋白质、小肽、氨基酸和脂肪酸衍生物等。同一配体能激活这个家族中的不同成员,例如,至少有 9 种连接 G 蛋白受体能被肾上腺素激活,有 5 种以上能被乙酰胆碱激活,有 15 种能被血清素激活。根据受体接受信号后是激活相关酶的活性还是抑制相关酶的活性,可将它们分为刺激型受体(stimulatory receptor, R_s)和抑制型受体(inhibitory receptor, R_i)。属于刺激型受体的有:肾上腺素(β 型)受体、后叶加压素受体、胰高血糖素受体、促黄体生长激素受体、促卵泡激素受体、促甲状腺素受体、促肾上腺皮质激素受体以及肠促胰酶素受体等。属于抑制型受体的有:肾上腺素(α_2 型)受体、阿片肽受体、乙酰胆碱(M)受体和生长激素释放的抑制因子受体等。在一个特定的细胞中,可以有任何数目的上述类型受体,通常是多于一种类型。例如大鼠脂肪细胞中至少有 5 种 R_s 受体和 2 种 R_i 受体。

10.5.2.2 异三聚体 GTP 结合蛋白

异三聚体 GTP 结合蛋白(trimeric GTP - binding proteins)是由 α、β、γ 3 种不同肽链组成,它将受体与质膜上的相关酶或离子通道相偶联,它在结构上不同于单链 GTP 结合蛋白(单体 GTP 酶),不过这两种 GTP 结合蛋白都具有 GTP 酶活性,并都具有分子开关的功能,当 GTP 与其结合时处于活性状态,当 GDP 与其结合时便处于失活状态,它们都可简称为 G 蛋白。这里的活性通常指分子作为一种信号启动细胞中的某一事件。当胞外配体结合到连接 G 蛋白受体时,受体改变其构象,并通过使异三聚体 G 蛋白上的 GDP 脱去,换为 GTP,以此将 G 蛋白激活,当 G 蛋白水解自身结合的 GTP 而变为 GDP 时,开关就关闭了。但是当 G 蛋白失活之前,它已经与受体脱离,并将信息传给下游因子。根据 G 蛋白从受体接受信号后,对相关酶是产生激活效应还是抑制效应,可将它们分为刺激型 G 蛋白(stimulatory G protein, G_s)和抑制型 G 蛋白(inhibitory G protein, G_i)(图 10 - 10)。现在已经纯化出 G_s 和

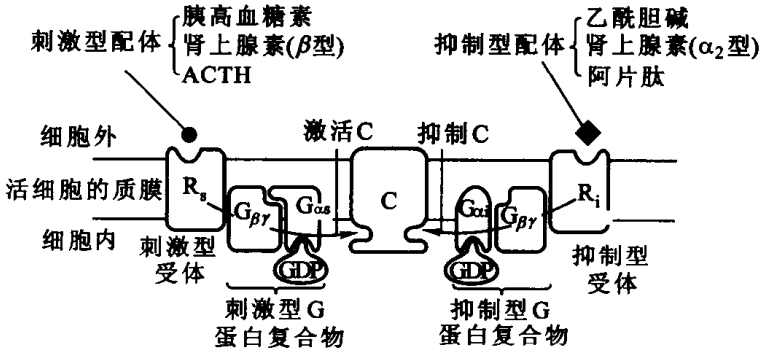


图 10 - 10 激素通过刺激型或抑制型 G 蛋白激活或抑制腺苷酸环化酶(C)图解(引自 H. Lodish, 等)

G_i，二者的结构和功能很相似。相对分子质量均为 $8.0\times10^4\sim1.0\times10^5$，都是由 α、β 和 γ 亚基组成的异三聚体，二者的 β 亚基非常相似，相对分子质量 3.6×10^4。二者的 γ 亚基也很相似，相对分子质量 $5.0\times10^3\sim8.0\times10^3$。β、γ 形成复合物，在自然条件下不分离。βγ 复合物使 α 亚基锚定在质膜上。二者的 α 亚基都有两个结合位点：一是结合 GTP 或其类似物的位点，具有 GTP 酶活性，能够水解 GTP；另外一个是含有负价键的修饰位点，可被细胞毒素 ADP 核糖基化，二者的不同之处是 G_s 的 α_s 亚基能被霍乱毒素 ADP 核糖基化，而 G_i 和 α_i 亚基能被百日咳毒素 ADP 核糖基化。G_s 和 G_i 都能调节与其相应受体的亲和性以及作用于腺苷酸环化酶。

大多数连接 G 蛋白受体激活后都可启动一系列的事件，以改变一种或多种胞内小信号分子的浓度，这些小信号分子就是胞内信号介导因子，称为第二信使。它们将信息继续传递，作用最广泛的胞内信号介导因子是 cAMP 和 Ca^{2+} 等。这样大多数连接 G 蛋白受体能够调控 cAMP 或 Ca^{2+} 的浓度。它们涉及到两个极重要的胞内信号通路：cAMP 信号通路和磷酯酰肌醇信号通路。

R_s 为与 G_s 相互作用的刺激型受体，R_i 为与 G_i 相互作用的抑制型受体。R_s 由一组不同分子组成，各个分子的大小、形状以及与激素结合位置的特异性不同，但却都与 G_s 作用。R_i 由一组不同分子组成，各个分子的大小、形状以及与激素结合位置的特异性不同，但却都与 G_i 作用。单个细胞可具有不同类型的 R_s 和 R_i 受体。

10.5.2.3 cAMP 信号通路

许多胞外信号通过控制 cAMP 的水平来发挥作用，cAMP 是由腺苷酸环化酶（adenylyl cyclase）催化合成的，腺苷酸环化酶是大约由 1 100 个氨基酸残基组成的糖蛋白，相对分子质量约为 1.5×10^5（图 10－11）。腺苷酸环化酶可与 G_s 或 G_i 分离，而不丧失它的酶活性。在 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 存在下，腺苷酸环化酶催化 ATP 生成 3′，5′－环腺苷酸（cAMP）。作为信号通路的胞内第二信使的 cAMP，在细胞内的浓度被严格地控制（正常状况下$\leqslant10^{-6}$mol/L），并且能够对细胞外信号产生快速的应答。例如，当刺激型激素存在时，cAMP 水平在 1 s 内增加 5 倍以上。细胞内另一类型的酶即环核苷酸磷酸二酯酶（PDE）可快速地降解生成 5′－腺苷酸（5′－AMP），使细胞内 cAMP 水平下降。PDE 的活性是依赖于 Ca^{2+} 和钙调素（CaM），而且细胞内的 Ca^{2+} 浓度又受其他信号通路调节。cAMP 主要是改变腺苷酸环化酶活性来控制 cAMP 的合成，而不是改变磷酸二酯酶的活性来控制 cAMP 的分解。甾类激素在不同靶细胞中产生不同效应，这是由于靶细胞对胞外信号产生不同的反应致使胞内 cAMP 浓度发生不同的变化。但是在一定的靶细胞中激活腺苷酸环化酶的配体，通常产生相同的效应，例如至少有 4 种激素能激活脂肪细胞中的腺苷酸环化酶，其方式是它们的受体通过 G 蛋白与腺苷酸环化酶偶联，这里的 G 蛋白就属于刺激型的 G 蛋白（G_s）。

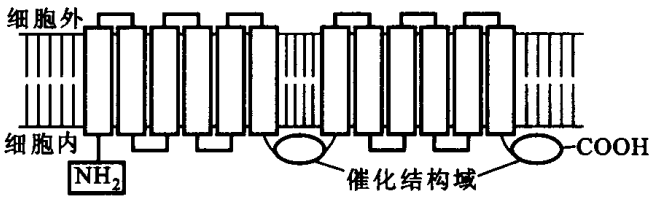


图 10－11 哺乳动物细胞腺苷酸环化酶的图解
该酶具有两簇由 6 次跨膜的区段组成，在质膜的胞内一侧，酶具有两个相似的催化结构域（引自 H. Lodish，等）

G_s 蛋白的 β 和 γ 亚基形成紧密的复合物将整个蛋白锚定在质膜细胞质一侧，无活性时

G_s 蛋白以异三聚体形式存在，α_s 亚基与 GDP 相结合，当受体被信号分子刺激后，α_s 上的 GDP 换成了 GTP，这使得 α_s 亚基与 βγ 复合物相解离，α_s 亚基与腺苷酸环化酶相结合，激活腺苷酸环化酶，在腺苷酸环化酸催化下由 ATP 生成 cAMP，从而使细胞内 cAMP 的浓度迅速增加(图 10－12)。

如果细胞对胞外信号分子的变化能迅速作出反应，那么信号分子一旦脱离受体后，腺苷酸环化酶的活性状态就应能迅速逆转。细胞确实有这种对变化迅速作出反应的能力，实际上 α_s 的活性形式是短暂的，当 α_s 结合到腺苷酸环化酶后，α_s 就会产生 GTP 酶活性将结合其上的 GTP 水解成 GDP，α_s 变为失活状态，随后再与 βγ 复合物相结合，重新组成无活性的 G_s 蛋白。

需要指出的是相同信号分子即能增加又能降低 cAMP 在胞内的浓度，这依赖于信号结合的受体类型。例如，当肾上腺激素与 β 肾上腺素受体结合时，它将腺苷酸环化酶激活，而当它与 α_2 肾上腺素受体结合时，它却抑制这种酶的活性，这种差异是由于将受体与环化酶偶联起来的 G 蛋白种类不同，将 β 肾上腺素受体与环化酶偶联起来的是 G_s，而将 α_2 肾上腺素与环化酶偶联起来的是 G_i。G_s 与 G_i 组成上的差异主要是 α 亚基的不同，G_i 发挥抑制作用的方式或是直接与环化酶结合抑制酶的活性，或是与自由的 α_s 结合阻止 α_s 激活环化酶。

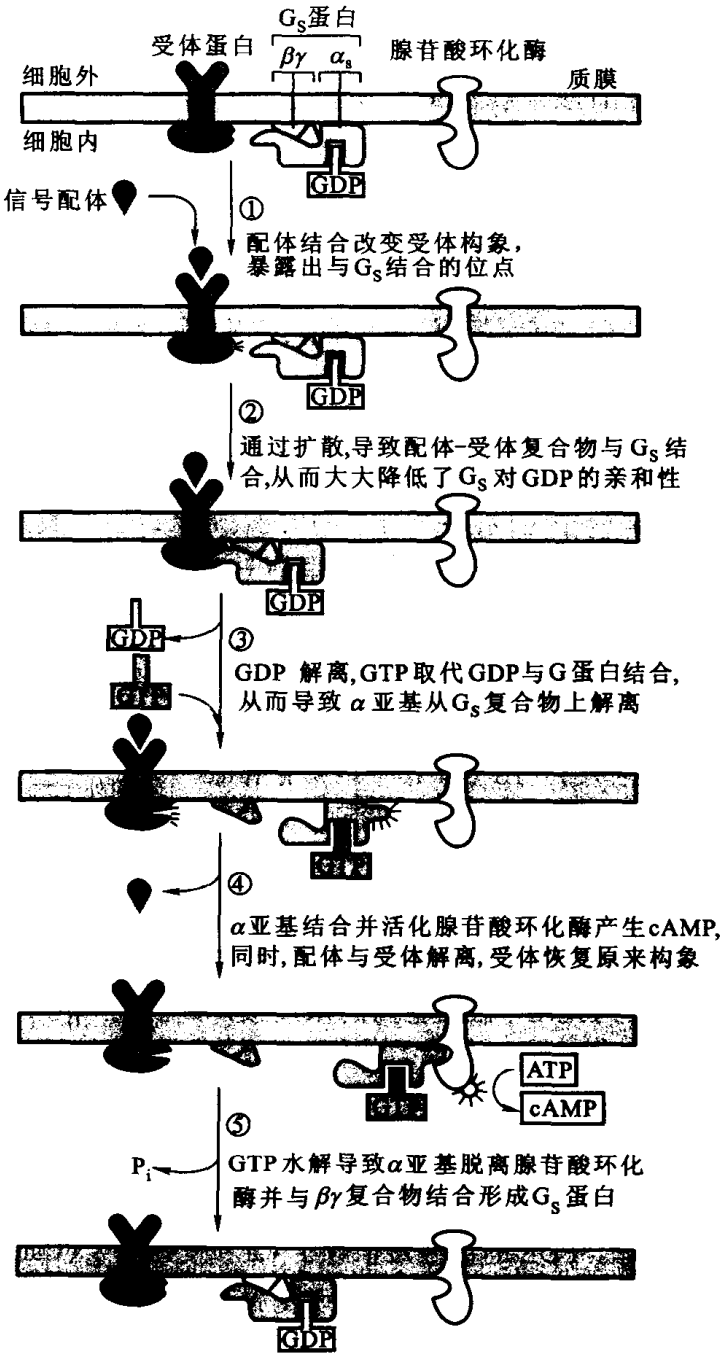


图 10－12　G_s 将受体激活与腺苷酸环化酶激活偶联的机制模型
(引自 B. Alberts, 等)

cAMP 在细胞中产生效应的方式是它能够将 cAMP 依赖性蛋白激酶(简称 PKA)激活，在蛋白激酶 A 的催化下，ATP 末端的磷酸基团能够转移到相应蛋白质特定的丝氨酸/苏氨酸残基上。

所有动物细胞中都有蛋白激酶 A 存在，这也说明了 cAMP 的作用具有相当的普遍性，目前对于 cAMP 在动物细胞中的其他功能，仅仅知道它能调节嗅觉神经中一种特定的离子

通道。蛋白激酶 A 的底物在不同细胞中是有差别的，cAMP 的具体作用依赖于靶细胞的类型。

在失活状态时，蛋白激酶 A 为含 4 个亚基的复合物(图 10－13)，包括两个催化亚基和两个结合 cAMP 的调节亚基，cAMP 的结合可改变调节亚基的构象，使调节亚基从复合体上分离，释放出的催化亚基产生活性，它们将特定的底物蛋白磷酸化。

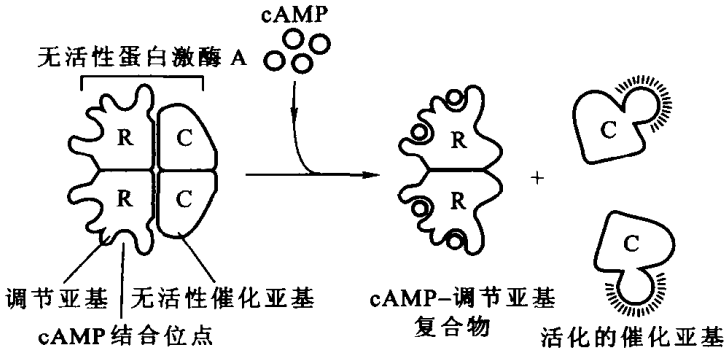


图 10－13 cAMP 活化 cAMP 依赖性蛋白激酶 A
R 为调节亚基；C 为催化亚基(引自 B. Alberts, 等)

cAMP 介导的蛋白磷酸化，最初是在研究骨骼肌细胞糖原代谢时被证实的，糖原是葡萄糖主要的贮存形式，它在骨骼肌细胞中的合成和降解是由肾上腺素调节的。例如，当动物受到惊吓或处于紧张状态时，它的肾上腺就会分泌肾上腺素，使身体的各种组织处于紧张状态。在肾上腺素产生作用的过程中，肾上腺素诱导肌细胞分解糖原产生 1－P－葡萄糖，同时中断糖原合成，随后葡萄糖被氧化产生 ATP，为维持肌肉的收缩提供能量。这样肾上腺素保证了肌细胞的正常活动。肾上腺素是通过与肌细胞表面的肾上腺素受体相结合而发挥作用的，它能使胞质中的 cAMP 水平提高，cAMP 激活蛋白激酶 A，蛋白激酶 A 又将两种酶磷酸化，第一种是磷酸酶激酶，这是最早被发现的蛋白激酶，磷酸酶激酶又将糖原磷酸酶磷酸化，由此将糖原分解成葡萄糖，葡萄糖进入糖酵解过程。蛋白激酶 A 磷酸化的第二种酶是糖原合成酶，它是由葡萄糖合成糖原时最后一步所需要的酶。将这种酶磷酸化可抑制它的活性，其结果是中断糖原的合成。通过这种作用方式，cAMP 水平的提高既能刺激糖原的分解，又能抑制糖原的合成，这样为细胞提供了大量的葡萄糖。

蛋白激酶 A 被激活后，其催化亚基可进入细胞核中，磷酸化一种称为 cAMP 应答元件结合蛋白(cAMP response element binding proteins, CREB)的丝氨酸残基。磷酸化的 CREB 蛋白被激活，它作为基因转录的调节蛋白识别并结合到靶基因的 cAMP 应答元件(cAMP response element, CRE)启动靶基因的转录(图 10－14)。

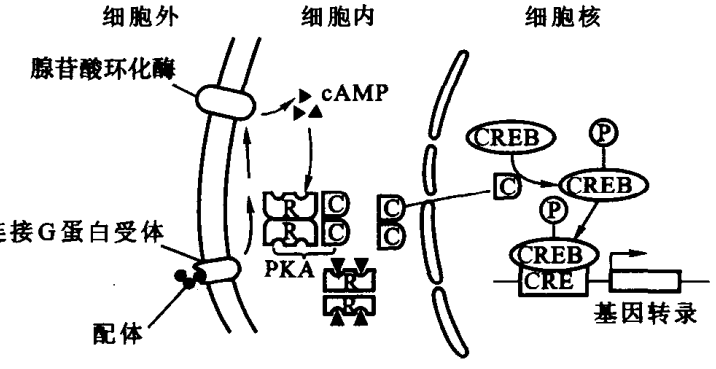


图 10－14 由 cAMP 诱导的基因转录(引自 H. Lodish, 等)

10.5.2.4　磷酯酰肌醇信号通路

异三聚体 G 蛋白除了将受体与腺苷环化酶偶联而产生各种效应外，它还能将受体与另一种关键性的酶——磷脂酶 C(phospholipase C)偶联，磷脂酶 C 的激活可导致胞质中 Ca^{2+} 浓度增加，Ca^{2+} 是一种作用更广泛的胞内信号介导因子。

当磷酯酰肌醇信号通路的相关受体激活后，通过 G 蛋白(Gq)的偶联作用，将位于质膜的磷脂酶 C－β(PLC－β)激活，在这种酶的催化下，二磷酸磷脂酰肌醇(PIP_2)分解成三磷酸肌醇(inositol triphosphate IP_3)和二酰基甘油(diaxylglycerol DG)，这两种产物分别作用这一通路的两个分支(图 10－15)。

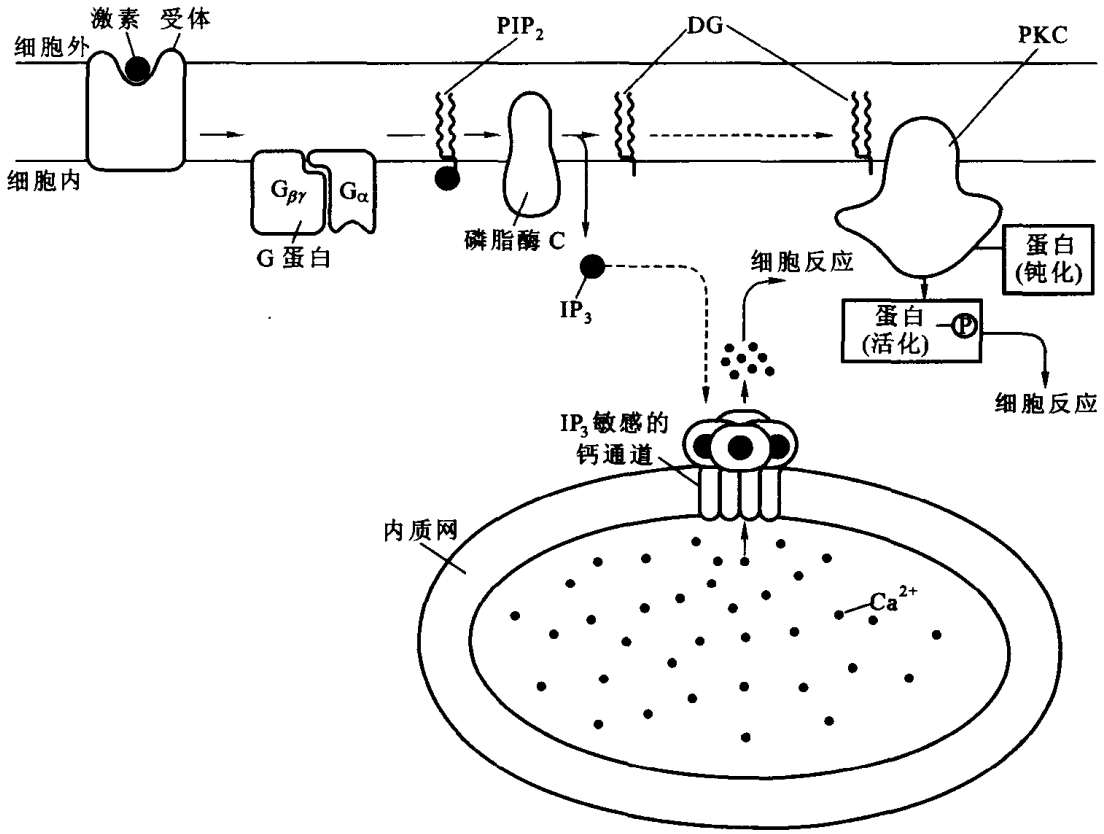


图 10－15　磷脂酰肌醇信号通路的图解(引自 H. Lodish, 等)

刺激磷脂酰肌醇代谢的外界信号分子有：神经递质如毒蕈碱型乙酰胆碱、α_1 肾上腺素、5－羟色胺和 H1 组胺等，某些多肽激素如 V_1 后叶加压素、血管紧张素Ⅱ、P 物质和促甲状腺素释放因子等，生长因子如血小板生长因子 PDGF，T 细胞有丝分裂原(植物凝集素和刀豆球蛋白 A 等)。这些外界信号分子与其相应的细胞表面受体结合，活化磷脂酰肌醇信号通路。PIP_2 是通过两种不同蛋白激酶依次磷酸化磷脂酰肌醇(PI)而形成的。首先 PI 激酶磷酸化 PI 成为磷酸磷脂酰肌醇(PIP)，然后通过第二个激酶磷酸化 PIP 成为 PIP_2。除了这两个激酶之外，还存在相应的磷酸单脂酶，能除掉 PIP_2 上 4 位或 5 位的磷酸，使 PIP_2 转回到 PI。所以质膜中的 PI、PIP、PIP_2 之间处于一种动态平衡状态。在哺乳动物细胞质膜中 PI 占总磷脂的 5%～7%，PIP 占 1%，PIP_2 占 0.4%。质膜中 PI 含量是相对比较高的，在两

种 PI 激酶的作用下，为质膜提供了 PIP_2 的充分来源，保证了磷脂酰肌醇信号通路的正常进行。

Ca^{2+} 作为胞内信号介导因子的最初的直接证据是 1947 年通过实验得到的。研究者发现在细胞中注射少量的 Ca^{2+} 就能引起骨骼肌细胞的收缩，最近的研究表明 Ca^{2+} 有着广泛的生理功能，涉及到细胞分泌、细胞增殖等。Ca^{2+} 信号传递有两种途径，一种存在于电激活的细胞中，另一种几乎存在于所有的真核细胞中。第一种途径主要是在神经细胞中发现的，在神经细胞中，质膜的去极化能引起 Ca^{2+} 进入神经末稍，并导致神经递质分泌，其方式是质膜去极化使电压门控型的 Ca^{2+} 通道打开，Ca^{2+} 通过此通道进入膜内。第二种途径是胞外信号分子结合到细胞表面受体，引起内质网中 Ca^{2+} 的释放，从胞外信号激活受体到内质网上 Ca^{2+} 通道的开放，这之间的联系是由 IP_3 来完成的(图 10－15)。

IP_3 是一种小的水溶性分子，它离开质膜后能迅速在胞液中扩散，通过与内质网膜上 IP_3 控制的 Ca^{2+} 释放通道相结合，将 Ca^{2+} 释放出来，提高了细胞溶质中游离 Ca^{2+} 的浓度。

Ca^{2+} 可活化各种 Ca^{2+} 结合蛋白引起细胞反应，Ca^{2+} 结合蛋白种类较多，分布范围也很广，从功能和性质上分，有些是与 Ca^{2+} 结合后产生构象变化，然后再去激活一些酶或调节离子通道，如钙调素、肌钙蛋白等，有些本身就是酶，Ca^{2+} 的结合直接调控其活性，还有些蛋白与 Ca^{2+} 结合仅仅是为了降低游离钙的浓度。目前对于钙结合蛋白中一种称为钙调素的蛋白了解的较为清楚。钙调素的发现对于 Ca^{2+} 信使功能研究起到了巨大的推动作用，是钙结合蛋白中研究最多的一种。钙调素(calmodulin，CaM)是一种耐热、酸性的小分子，可溶性球蛋白，由 148 个氨基酸残基组成。其中 30％左右为酸性氨基酸，不含半胱氨酸，色氨酸及羟脯氨酸，通过翻译后修饰在其 115 位产生一个三甲基赖氨酸，自然界含有这种氨基酸的蛋白质是很少的。

CaM 的三维结构为哑铃形，每个哑铃球上有 2 个 Ca^{2+} 结合位点，长的中心螺旋形成哑铃柄，两个哑铃球依靠它相连。无 Ca^{2+} 结合时，两个球部沿着中心螺旋折叠，中心螺旋区被遮盖，结合 Ca^{2+} 后，此区暴露出来，并在 CaM 与靶酶相互作用中起重要作用(图 10－16)。

CaM 发挥作用的方式有两种，一是直接与靶酶结合，诱导靶酶的活性变化，从而调节它们的活性，如磷酸二酯酶，cAMP 环化酶，Ca^{2+} － ATP 酶等，二是先活化依赖 Ca^{2+}/CaM 的蛋白激酶，再由蛋白激酶磷酸化它们的靶酶，来影响那些酶的活性，如磷酸化酶糖原磷酸酶等。正常条件下，这一过程是可逆的，反应方向受细胞溶质内游离 Ca^{2+} 浓度控制。增加胞溶质内的 Ca^{2+} 浓度，将促使钙调素－酶复合物的形成，降低 Ca^{2+} 浓度，此复合物趋向解离，这样相关酶的活性也随之处于激活或失活两种状态。

一般来说，细胞溶质中游离的 Ca^{2+} 的浓度是非常低的(低于 10^{-7} mol/L)。但它在胞间液中的浓度(约 10^{-3} mol/L)和内质网中的浓度是比较高的。这样 Ca^{2+} 在细胞质膜内外和内质网内外形成一个很高的离子梯度，当一个信号将膜上 Ca^{2+} 通道瞬时打开时，Ca^{2+} 就会迅速进入胞液，并激活钙结合蛋白。质膜和内质网上的钙泵将细胞溶质中的 Ca^{2+} 泵到细胞外和内质网腔中，使细胞溶质中的 Ca^{2+} 浓度恢复到低水平，这样使活化的 CaM－酶复合物趋向解离，相关蛋白失去活性，终止了细胞反应。

二酰基甘油有两种潜在的信号传递作用：①它能进一步分解成花生四烯酸，这种酸本身可作为一种信号起作用；②更为重要的是它能激活一种关键性的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，即蛋白激酶 C(PKC)。PKC 存在于细胞溶质中，由单肽链形成，相对分子质量为 8.0×10^4，

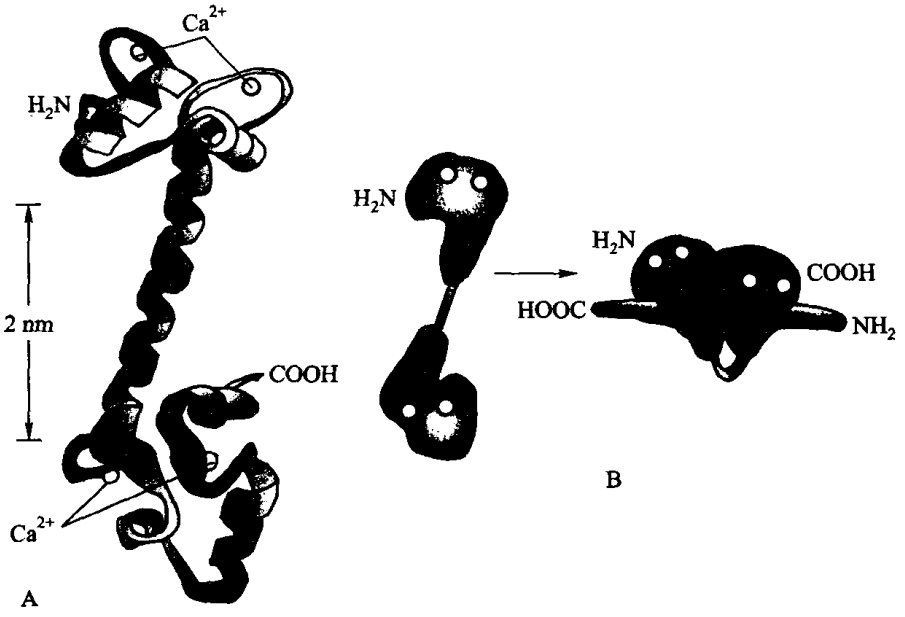


图 10－16　钙调素结构模型

A. 钙－钙调素复合物的亚铃状结构；B. 钙－钙调素复合物与靶蛋白的结合

(引自 B. Alberts, 等)

它有两个功能区，一个是亲水的催化活性中心，另一个是疏水的膜结合区。目前在哺乳动物细胞中已发现 PKC 有十几种亚类，其中至少 4 种是由 DG 激活的。

在未受到刺激的细胞中，PKC 主要分布在细胞溶质中，呈非活性构象。当细胞受到刺激时，PIP_2 水解，质膜上 DG 瞬间积累，由于细胞溶质中 Ca^{2+} 浓度升高，使细胞溶质中 PKC 转位到质膜内表面，在质膜上 PKC 受 Ca^{2+}，DG 和磷酯酰丝氨酸(PS)共同作用而激活(图 10－17)。活化的 PKC 磷酸化细胞溶质中底物蛋白的丝氨酸/苏氨酸残基。

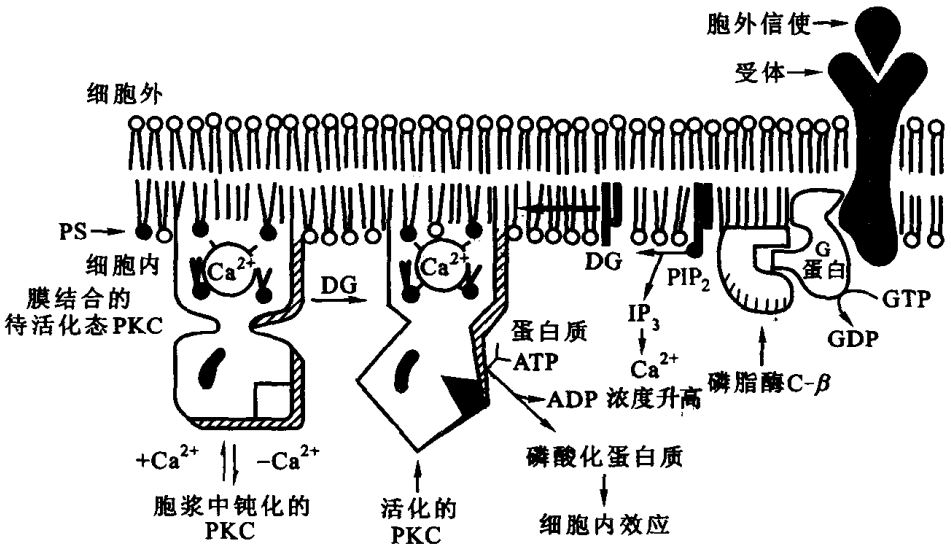


图 10－17　PKC 的激活机制图解(仿 R. Bell)

DG 只是 PIP_2 水解的暂时性产物，它靠两种方式终止其信使作用：一种是被 DG 激酶磷酸化成为磷脂酸(PA)，PA 被 CTP 磷酸化成为 CMP－磷脂酸，再与肌醇作用合成 PI；另一种方式是 DG 被 DG 脂酶水解成为单脂酰甘油，再进一步水解成游离的不饱和脂肪酸、花生四烯酸和甘油。花生四烯酸氧化成为许多生物活性代谢物如前列腺素、白三烯等。从细胞中释放出来的这些生物活性代谢物可作用于自身或邻近细胞上的受体，引起细胞反应。

由于 PIP_2 裂解产生的 DG 通过代谢而迅速分解，不能持续激活 PKC。而细胞增殖或细胞分化需要 PKC 维持一个较长时期的活性。这样，延长 PKC 的活性将依赖于另一种方式，即磷酯酶催化主要的膜磷酯成分磷酯酰胆碱裂解产生 DG。PKC 磷酸化何种靶蛋白与细胞类型有关。在脑中 PKC 浓度非常高，PKC 磷酸化神经细胞离子通道，改变离子通道的性质，使神经细胞质膜处于激发状态。

在许多细胞中，PKC 可增强特定基因的转录。目前已至少知道有两条通路可达此目的(图 10－18)：一是 PKC 活化一条蛋白激酶的级联反应，磷酸化那些与基因调节序列结合的调节蛋白，磷酸化的调节蛋白与基因调节序列结合活化基因转录；二是 PKC 磷酸化与基因调节蛋白结合的抑制蛋白，使细胞质中的基因调节蛋白从抑制状态下释放出来，进入细胞核，刺激特定基因转录。

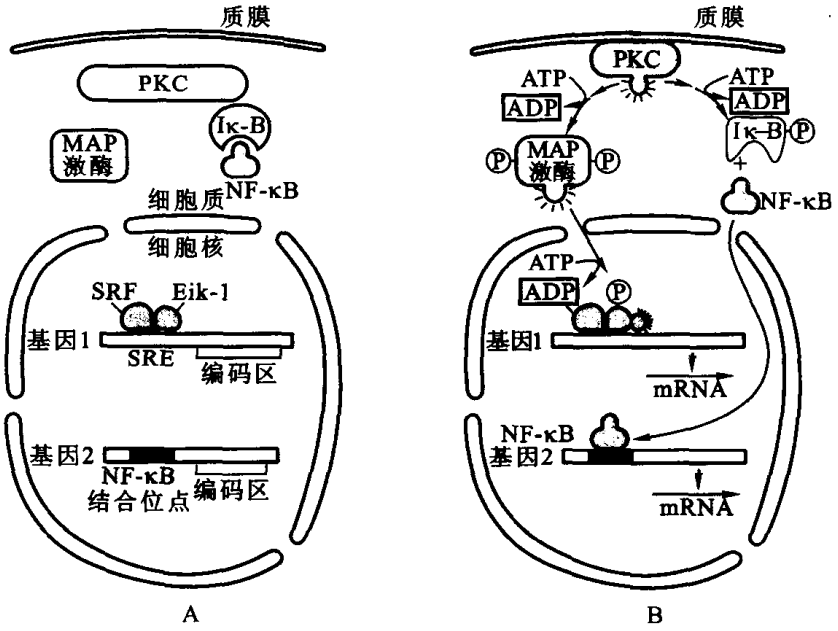


图 10－18 PKC 活化基因转录的两条通路

A. PKC 无活性时，基因 1 和基因 2 不转录；B. PKC 活化时，基因 1 和基因 2 转录

(引自 B. Alberts, 等)

佛波脂(TPA)是一种肿瘤促进剂，在极低浓度下，TPA 就可渗入到质膜中，取代 DG 与 PKC 结合，激活 PKC。TPA 不像 DG 那样很快地被降解，其代谢相当慢，因此 TPA 可长期地使 PKC 过度的、不可逆地活化，从而导致细胞增殖失控。

磷脂酰肌醇信号通路两个分支中的 DG 和 IP_3，都可用特定的药物来模拟，如钙离子载体 A23187 可模拟 IP_3 的效应；TPA 模拟 DG 的作用。实验中发现只有上述两个分支模拟物联合使用才能导致细胞完全反应，例如刺激细胞的增殖。

10.5.3 酶连受体的信号传递

如同连接 G 蛋白受体一样,酶连受体(enzyme - linked receptor)是一类跨膜蛋白,结合配体的区域位于质膜外表面,但它位于质膜内表面的部分不与异三聚体 G 蛋白相联系,而是自身具有酶的活性。连接 G 蛋白受体为 7 次跨膜的多肽链,而这类受体为单跨膜的多肽链。当受体被激活时,便能作为酶行使功能。与其他受体相比,虽然这类受体在作用方式上具有相同的特点,但在结构上是异源性的。

已知的酶连受体有 4 种类型:①鸟苷酸环化酶受体,催化细胞溶质中 cGMP 的产生;②酪氨酸蛋白激酶受体,将一些胞内信号传递蛋白特定的酪氨酸残基磷酸化;③酪氨酸磷酸酶受体,能将信号传递蛋白酪氨酸残基上的磷酸基团去除;④丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶受体,将某些胞内信号传递蛋白上的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化。

10.5.3.1 鸟苷酸环化酶受体

此受体被信号激活后,可直接催化 GTP 反应产生 cGMP,这是因为受体位于胞质的一侧有一个胞内鸟苷酸环化酶催化区域,当受体有信号分子结合时,表现出鸟苷酸环化酶活性。cGMP 可结合到 cGMP 依赖性蛋白激酶(PKG)上,并将这些酶激活,被激活的酶将特定蛋白上的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化。这样鸟苷酸环化酶受体利用 cGMP 作为胞内信号介导因子发挥作用,其方式类似 cAMP,只是一个由信号刺激直接产生,另一个要通过 G 蛋白传递信息才能产生。

现举例说明此受体的作用,心房利钠素(ANP)属于一个多肽激素的家族,当血压升高时,它由心房的肌细胞分泌,ANP 刺激肾脏排出 Na^+ 和水,并诱导血管壁中的平滑肌细胞松驰,这两种效应都能降低血压。介导这些反应的 ANP 受体存在于肾细胞和血管壁平滑肌细胞膜上,位于胞外的部分有一个结合 ANP 的位点,胞内部分为鸟苷酸环化酶催化区域,ANP 与受体结合可刺激鸟苷酸环化酶活性产生,并催化 GTP 生成 cGMP,cGMP 结合并激活 PKG,活化的 PKG 将特定蛋白上的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化,产生相应的生物学效应。

除了作为受体与质膜结合的鸟苷酸环化酶以外,在细胞质中还存在可溶解的颗粒状的鸟苷酸环化酶。NO 和 CO 可作为细胞间的信号直接穿过质膜进入细胞,与胞内铁离子一起激活作为胞内受体的鸟苷酸环化酶产生 cGMP。

10.5.3.2 酪氨酸蛋白激酶受体

许多生长与分化因子的受体属于此种类型,最早被鉴定出来的是 EGF 受体,除此之外,目前已知与生长因子相关的此类受体还有血小板生长因子(PDGF)受体、巨噬细胞集落刺激因子(M - CSF)受体、胰岛素受体、类胰岛素生长因子 - 1(IGF - 1)受体、肝细胞生长因子(HGF)受体、神经生长因子(NGF)受体和血管内皮生长因子(VEGF)受体等。这类受体的胞外部分被糖基化成为信号结合部位,受体激活时,胞内的酪氨酸激酶催化区域,可将 ATP 上的磷酸基因转移到特定蛋白的酪氨酸残基上。酪氨酸蛋白激酶受体家族按其结构可分成一些亚族(图 10 - 19),每种受体都可通过自磷酸化启动胞内信号传递。

对于胞外信号分子结合到受体上将质膜内侧的催化区域激活的机制,现已基本清楚。酪氨酸激酶受体是一个单链跨膜蛋白,仅由一个单链分子的构象变化来传递胞外信息是困

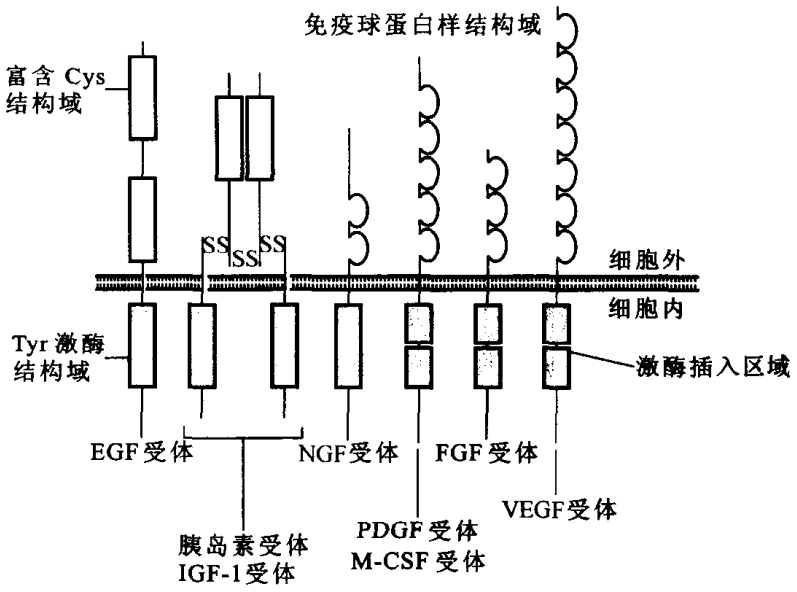


图 10－19 酪氨酸蛋白激酶受体的 6 个亚族(仿 B. Alberts, 等)

难的,通过对 EGF 受体的研究发现,配体的结合使单个 EGF 受体的胞外部分构象发生变化,受体聚合成二聚体,导致受体胞内区域互相靠近,并互相磷酸化受体胞内区域的酪氨酸残基(图 10－20)。因为上述的受体磷酸化在二聚体内产生,所以称这种磷酸化为受体的自磷酸化(autophosphorylation)。PDGF 本身是二聚体,它可使两个 PDGF 受体交联在一起。受体二聚体的形成是单体受体激活中一个普遍的激活机制。

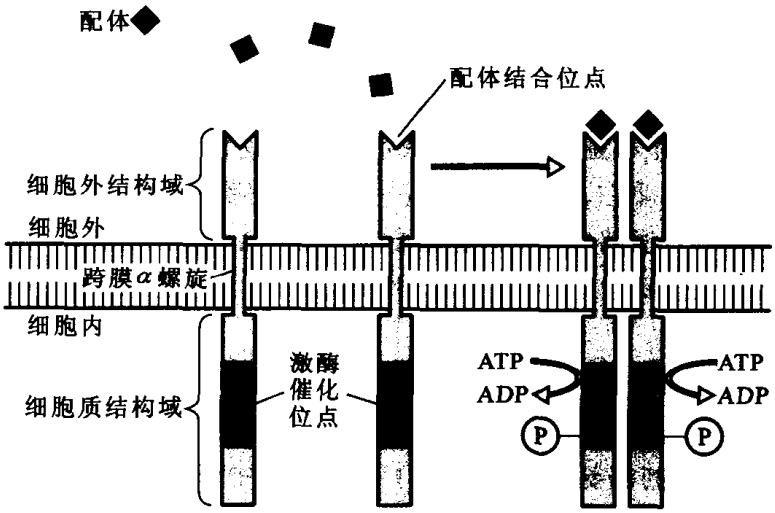


图 10－20 酪氨酸蛋白激酶的二聚化和活化(仿 H. Lodish, 等)

活化的受体可以结合许多细胞溶质中带有 SH2 结构域的信号蛋白,并磷酸化它们的酪氨酸残基使之活化。现已发现的这些信号蛋白有:GTP 酶活化的蛋白(GTPase－activating proteins, GAPs)、磷脂酶 C－γ,磷脂酰肌醇 3－激酶(PI_3 激酶)、SyP 酪氨酸磷酸酶以及 Src 类的非受体酪氨酸蛋白激酶等。GAP 使与 Ras 蛋白结合的 GTP 水解成 GDP 的速率

增加。PLC－γ 的作用与 PLC－β 一样。PI_3 激酶可使磷酯酰肌醇的肌醇环上的 3 位磷酸化。

细胞溶质中与活化的酪氨酸蛋白激酶结合的信号蛋白尽管结构和功能各异，但它们都具有两个高度保守而无催化活性的结构域，即 SH2 和 SH3。之所以这样命名是因为这些结构域首先在 Src 蛋白中发现，所以称为 Src 同源区。SH2 结构域能够识别磷酸化的酪氨酸残基，并使含有 SH2 的蛋白结合到活化的酪氨酸蛋白激酶受体和其他胞内信号蛋白被瞬间磷酸化的酪氨酸残基上。至于 SH3 结构域的功能可能与细胞内其他信号蛋白结合有关。

线虫中有一种称为 Sem－5 的蛋白具有 SH2 和 SH3 结构域。这种蛋白本身无催化功能，但可连接活化的酪氨酸蛋白激酶受体和其他不含 SH2 和 SH3 的蛋白，所以称为接头蛋白。如果 *Sem* －5 基因发生突变，则可阻断来自酪氨酸蛋白激酶受体的信号通路，严重影响线虫的发育。在大多数动物细胞中都有 Sem－5 同源蛋白，例如，果蝇中的受体下游激酶和小鼠中的鸟苷酸释放因子结合蛋白(guanine nucleotide releasing factor binding protein)。

活化的酪氨酸蛋白激酶受体如何将信号传到细胞核内来调节基因表达，最终影响细胞的增殖和分化，对此目前了解较清楚的方式是通过 Ras 蛋白的传递(图 10－21)。Ras 蛋白是 *ras* 基因的产物，由 190 个氨基酸残基组成，相对分子质量为 2.1×10^4，称为 $p21^{ras}$。Ras 通过共价键与戊烯基连接使之锚定在质膜的胞质侧面上。Ras 蛋白不是蛋白激酶，它能与 GDP 或 GTP 结合。当 Ras 与 GTP 结合时处于活化状态，而与 GDP 结合时则处于失活状态。所以 Ras 的功能可视为分子开关，在上述两种不同构象之间来回转换。这种分子开关的特性属于 G 蛋白的主要特性，但 Ras 水解 GTP 的能力比与受体相连的 G 蛋白至少要慢 100 倍。由于细胞溶质中 GTP 比 GDP 的浓度高 10 倍，这就意味着，如果缺少其他因素的影响，一旦 GTP 与 Ras 结合就会使 Ras 永久保持活性状态。事实上，细胞中有两类信号蛋白通过影响 Ras 活化和钝化状态的转换来调节 Ras 的活性。GAP 可以增强 Ras 水解 GTP 的能力，使 Ras 失活。另一种称为鸟苷酸释放蛋白(guanine nucleotide releasing protein, GNRPs)，又称为鸟苷酸释放因子(GRF)，它能使 Ras 释放出 GDP，接着与 GTP 结合。GNRPs 首先是在果蝇 R7 光受体细胞发育的研究中发现的。有一种 sevenless(Sev)突变体可影响 R7 的发育，这是因为 *sev* 编码酪氨酸蛋白激酶受体，Sev 仅在 R7 前体细胞中表达，其配体是 R8 质膜上 Boss 蛋白，*sev* 基因突变将使 R7 细胞不能接受 R8 质膜上信号分子传递的信息。在 Sev 的信号通路中，需要 Ras 蛋白，以及 *Sos*(Son－of－sevenless)基因编码的 Sos 蛋白即 GNRPs。Sos 刺激 GDP 从 Ras 中释放出来，细胞溶质中的 GTP 进而与 Ras 结合，使 Ras 活化。

上述的接头蛋白起到连接活化的酪氨酸蛋白激酶受体和 GNRPs 的作用。当配体与酪氨酸蛋白激酶受体结合使受体二聚化，受体胞内区互相磷酸化酪氨酸残基导致受体的自磷酸化，受体胞内区磷酸化的酪氨酸残基吸引了细胞溶质中带有 SH2 和 SH3 的靶蛋白：GAP、PLC－γ、PI_3 激酶、Syp 酪氨酸磷酸酶、接头蛋白(GRB2 等)趋向受体，靶蛋白的 SH2 与受体的磷酸化的酪氨酸残基结合，受体酪氨酸蛋白激酶磷酸化靶蛋白的酪氨酸残基使靶蛋白活化。活化的接头蛋白通过本身的 SH3 与 GNRPs 结合并使之活化。GNRPs 使 Ras－GDP 的 GDP 释放，细胞溶质中的 GTP 与 Ras 结合成 Ras－GDP 因而活化了 Ras。目前看来，酪氨酸蛋白激酶受体活化 Ras 主要是通过活化 GNRPs，而不是通过钝化 GAP 来实现的。

Ras－GTP 存在时间相当短促，在 1 s 以内 GAP 与 Ras 结合，增强了 Ras 的 GTP 酶的活性，使 GTP 水解成为 Ras－GDP，导致 Ras 的钝化。看来从活化的 Ras 向其下游传递信号

是以脉冲方式进行的。

活化的 Ras 蛋白(Ras－GTP)如何进一步将信号传递到细胞核中,并最终调控基因的表

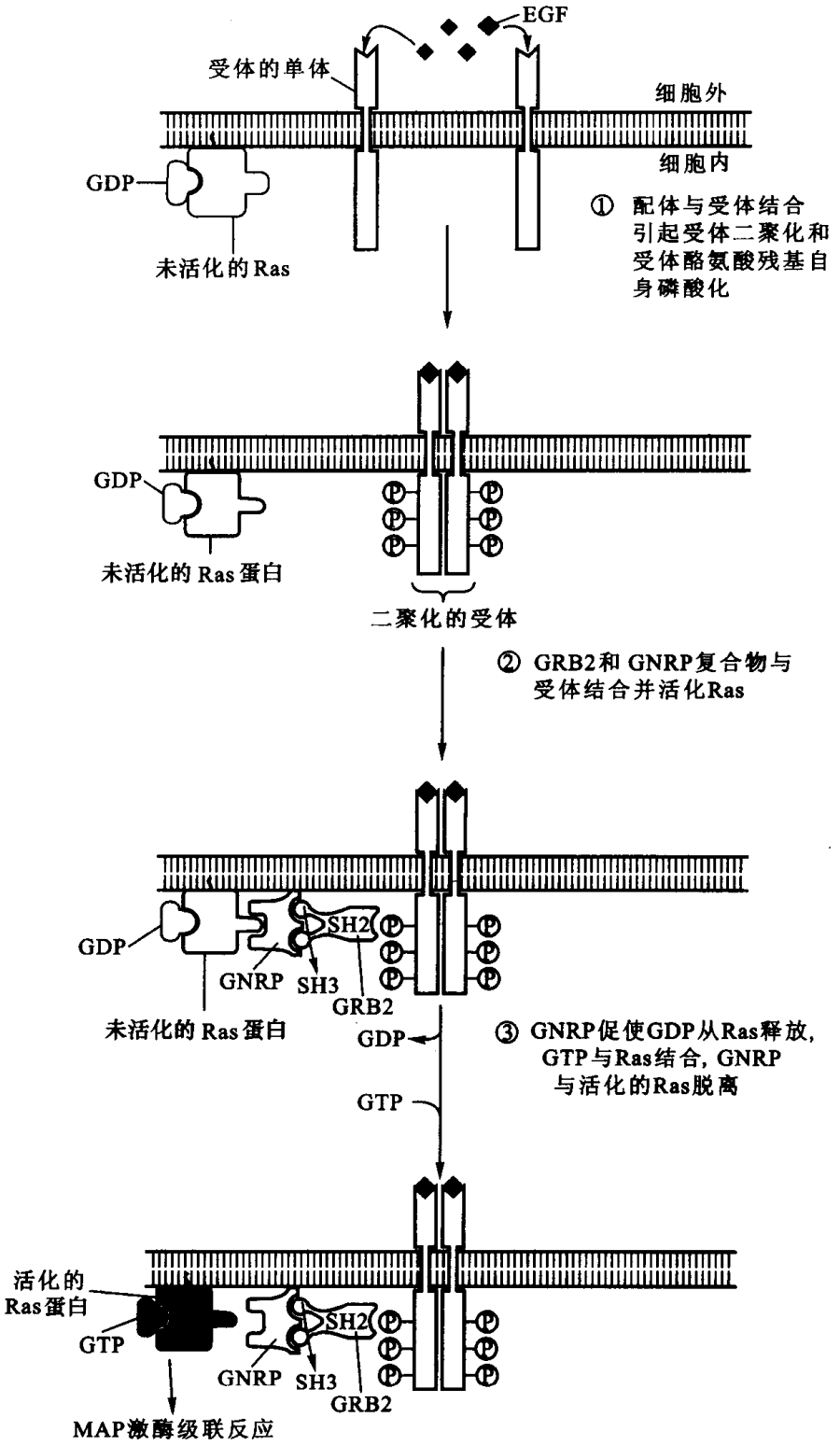


图 10－21 激素(例如 EGF)与酪氨酸蛋白激酶受体结合将 Ras 蛋白活化图解

(仿 B. Alberts, 等)

达呢？由于活化的 Ras 蛋白的寿命极短，结合其上的 GTP 很快被水解成 GDP 而使 Ras 蛋白失活。这样，短寿命的 Ras 蛋白所携带的信号必须转变为长寿命的信号，维持信号向下游传递(图 10－22)。当 Ras 蛋白活化后，位于细胞溶质中的 Raf 蛋白趋向到质膜胞内侧并与 Ras 蛋白结合，Ras 蛋白使 Raf 蛋白活化。Raf 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，它使靶蛋白上的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化。丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化的蛋白其寿命比酪氨酸残基磷酸化的蛋白长。在 Raf 活化后向下游传递信号的过程中包括了许多丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化级联反应，其中特别重要的一种是有丝分裂原活化蛋白(mitogen-activated protein, MAP)激酶，又称为胞外信号调节的激酶(ERK)。这些激酶被众多的细胞外诱导细胞增殖和分化的信号激活。其中一些是通过酪氨酸蛋白激酶受体，而另一些是通过与 G 蛋白连接的受体的活化而激活的。

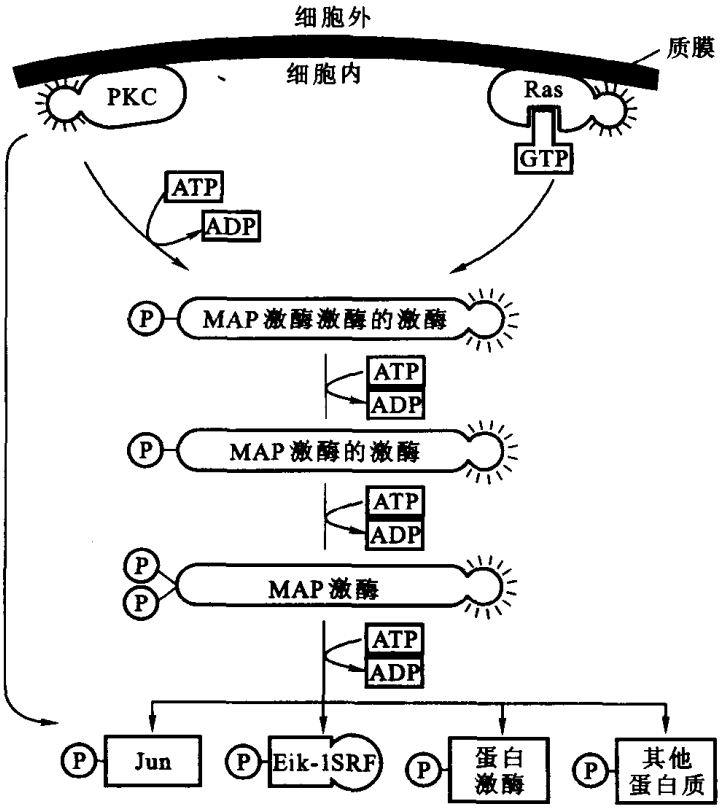


图 10－22 Ras 和 PKC 活化的丝氨酸/苏氨酸磷酸化的级联反应
(引自 B. Alberts, 等)

Raf 可使 MAP 激酶的激酶(MAPKK)的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化，从而活化了 MAPKK，故 Raf 亦可称为 MAPKKK。MAPKK 磷酸化 MAPK 的苏氨酸和酪氨酸两个残基(两个被磷酸化的残基之间只相隔一个谷氨酸残基)使之活化。这种双特异性的磷酸化就保证了 MAPK 不被其他蛋白激酶磷酸化，一直保持钝化状态，直至 MAPKK 活化后才能使 MAPK 活化，所以 MAPKK 是唯一催化 MAPK 磷酸化的酶。

活化的 MAPK 进入细胞核，通过磷酸化其他激酶或基因调节蛋白(转录因子)的丝氨酸/苏氨酸残基来将它们活化。通常细胞被生长因子刺激后，在几分钟内就可活化一套早期应答基因的转录，如 *jun* 和 *fos* 基因等。一种血清应答因子和 Eik－1 蛋白的复合物在活化转

录过程中发挥重要作用。该复合物持续地结合到 *fos* 和其他早期应答基因的调节序列上。当 MAPK 进入核中，使 Eik－1 磷酸化。因而活化了该复合物，导致 Fos 等基因的转录。此外，MAPK 可磷酸化 Jun，磷酸化的 Jun 和新产生的 Fos 结合成有活性的基因调节蛋白 AP1。

ras 被确定为典型的癌基因，在 25%～30% 的人肿瘤中，发现异常的 Ras 蛋白，在 Ras 的 12 位或 61 位残基出现点突变，由甘氨酸取代了缬氨酸，突变的 Ras 蛋白抑制本身以及 GAP 刺激的 GTP 酶的活性，因此不能使 Ras－GTP 转换成 Ras－GDP，导致 Ras 长期维持其活性状态，不停顿地向其下游发出放信号，引起细胞的异常增殖。

10.5.3.3 酪氨酸蛋白磷酸酶受体

此类受体激活后，能将特定蛋白的酪氨酸残基上的磷酸去除，即参与去磷酸化反应，这种受体高度特异的活性保证了酪氨酸磷酸化，仅在需要时而短暂存在，这样使静止细胞中酪氨酸磷酸化维持一个较低的水平，此种磷酸酶的作用不是酪氨酸蛋白激酶一个简单的逆反应，在细胞信号传递中，它还有自已独特的作用。

CD45 蛋白为具有受体结构的酪氨酸蛋白磷酸酶，它是造血细胞中含量很高的糖蛋白，具有典型的受体结构，其胞外部分为 400 个左右氨基酸组成的糖蛋白，有富含半胱氨酸的重复结构，形成典型的相当保守的“配体结合区”。CD45 在免疫 T 和 B 淋巴细胞的活化中具有重要的作用。T 细胞的活化，起源于胞外抗原与 T 细胞表面受体 TCR/CD3 复合物的结合。抗原与 TCR/CD3 结合后，最初引起的细胞反应，包括质膜磷脂酰肌醇信号系统的激活而将 PKC 激活和 Ca^{2+} 释放，最终导致 T 细胞活化。在缺失 CD45 的 T 细胞中，以上过程不能进行。一些研究结果表明，CD45 的作用可能是通过将一种 Src 酪氨酸蛋白激酶——Lck 去磷酸化实现的：Lck 第 505 位上酪氨酸磷酸化从而使 Lck 受到抑制，而 CD45 则使 Lck 去磷酸化而使其活化，活化的 Lck 继而使 PLC 磷酸化而启动磷酯酰肌醇信号通路，最后使 T 淋巴细胞活化。总的来说，目前对此类受体的功能和相应配体了解得还比较少。

10.5.3.4 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶受体

属于跨膜蛋白，位于胞外的区域接受信号，位于胞内的部分为丝氨酸/苏氨酸激酶催化区域，可催化靶蛋白上的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化。

转化生长因子 β(TGFβ)的受体就属此类，现已知 TGFβ 对于细胞的生存状态影响是非常大的，它的效应依其作用的细胞类型不同而异，它可通过抑制其它生长因子的效应来抑制细胞的增殖，刺激细胞外基质的合成，刺激骨髓的形成，此外在胚胎发育中可作为诱导信号。另外，在胞质中还存在着可溶性的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，如 MAP 激酶。

10.5.4 与酪氨酸蛋白激酶结合的受体

此类受体只有接受信号的结构域，缺少催化结构域，它们与无接受信号结构域的酪氨酸蛋白激酶相结合而发挥作用，它们的功能与酪氨酸蛋白激酶受体基本相似，只是作为激酶部分的蛋白与作为受体部分的蛋白是分别由两个基因编码的。

这类受体包括造血系统中大多数调节细胞增殖与分化的细胞因子受体，一些激素如生长激素和催乳素的受体，B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞上的抗原特异性受体。当配体与受体结合时，受体将与其相连的酪氨酸蛋白激酶激活，由此磷酸化各种靶蛋白的酪氨酸残基来传递信号。

目前已知的与酪氨酸蛋白激酶相连接的受体有两大类:一类是与 Src 蛋白家族相连接的受体;另一类是与 Janus 激酶家族相连接的受体。这些受体的功能与酪氨酸蛋白激酶受体的作用方式基本相似,其不同之处是它们的激酶被另一个基因编码,并以非共价键的方式与受体多肽链结合。

对于结合酪氨酸激酶受体来说,配体结合可引起两种或多种跨膜受体亚基聚合,一个研究的较为清楚的例子是 IL－2 受体(图 10－23),IL－2 受体由 3 个肽链组成(α、β、γ),与配体结合后,聚合形成一种有功能的受体复合物。

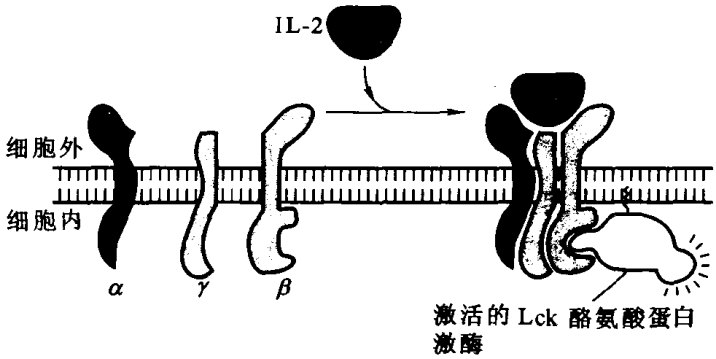


图 10－23 配体激活的 IL－2 受体的聚合(引自 B. Alberts, 等)

10.6 细胞信号转导通路间的相互关系

在分析各个信号通路时,有一个值得强调的重要问题,就是各通路间的关系。细胞中所有信号转导通路都不是完全独立的,而是存在着密切的相互关系,它们通过相互作用,相互协调,共同调控着细胞的生命活动,细胞中存在的是一个信号调控网络,这个网络即精巧又复杂。

cAMP 与 Ca^{2+} 胞内信号通路在一定水平上相互作用,具体表现为:①细胞溶质中的 Ca^{2+} 和 cAMP 的水平能相互影响,例如,一些分解和合成 cAMP 的酶的产生(cAMP 磷酸二酯酶和腺苷环化酶)是由 CaM 调控的,相反 PKA 能够磷酸化某些 Ca^{2+} 通道改变它们的状态,PKA 还能磷酸化 IP_3 在内质网上的受体,这既可能抑制又可能促进 IP_3 诱导的 Ca^{2+} 的释放,但究竟显示哪种作用,依赖于细胞的类型;②直接由 Ca^{2+} 和 cAMP 调节的酶能相互影响,例如,某些钙调素激酶能被 PKA 磷酸化;③受 Ca^{2+} 和 cAMP 调节的酶对下游靶分子产生综合效应,激酶 A 和钙调素激酶常常将同一蛋白的不同位点磷酸化。

骨骼肌中的磷酸激酶可作为 Ca^{2+} 和 cAMP 相互作用的例子,磷酸激酶可将糖原磷酸酶磷酸化,导致糖原降解。这种激酶含 4 个亚基,但实际上 4 个亚基只有一个亚基催化磷酸化反应,其余 3 个亚基起调节作用,使得整个酶复合体能被 cAMP 和 Ca^{2+} 激活。4 个亚基被称为 α、β、γ 和 δ,γ 亚基具有催化活性,δ 亚基为 Ca^{2+} 调节蛋白,α 和 β 亚基接受 cAMP 调节,这两个亚基都能被蛋白激酶 A 磷酸化。

最新的研究表明,CaM 依赖的 PDE 可被 cAMP 依赖的蛋白激酶磷酸化,结果使 PDE 与 CaM 亲和力降低,而 PDE 磷酸化又可被 CaM 阻断,或被 CaM 依赖的蛋白磷酸酶去磷酸化

所逆转，同时使 PDE 与 CaM 亲和力重新增加。

内 容 提 要

多细胞生物体由数以亿计的细胞组成具有不同功能的组织与器官，细胞既有精细的分工，又有密切的相互协作，以协调整体的生命活动。

细胞间信号传递的具体传送方式包括：①膜结合信号的传递，信号分子结合在细胞的质膜上，通过细胞间的直接接触将信号传递给靶细胞。与质膜结合的信号分子在整个信号分子中所占比例较小，大多数信号分子合成后由细胞分泌出来，通过传递作用于靶细胞。②间隙连接中的信号传递，在相邻的动物细胞之间可通过连接小体构成间接连接，这种连接在细胞间形成孔道，信号分子可通过这些孔道在相邻细胞间传递。③分泌信号的传递，信号分子从特定细胞中分泌出来，经过一定的距离到达靶细胞，这方式是胞间通讯的主要途径。根据具体的特点，又可将其分为 3 种类型：其一、自分泌信号传递，即细胞分泌的信号分子结合到自身的受体上引起反应；其二、旁分泌信号传递，即信号细胞分泌的信号分子只作用于环境中邻近的细胞；其三、内分泌信号传递，即信号细胞分泌的信号分子进入动物血液，并随血液到达身体各个部位的靶细胞。

从化学组成与结构来看，信号分子的种类是非常多的，但是根据其溶解性，可分为亲脂性和亲水性两类，小的亲脂性分子可容易地穿过细胞质膜，通常与胞内受体结合，亲水性信号分子及大的亲脂性信号分子不能穿过细胞质膜，只能与细胞表面受体结合，引起细胞反应。此外，某些气体分子也可作为信号分子调节靶细胞的功能。

信号分子与受体之间的结合是非常特异的，一种信号分子能否作用某种细胞，决定于这种细胞是否带有这种信号分子的受体。同时一种细胞有可能带有多种受体，并接受多种信号的刺激，所以，细胞表现出的生命现象，常常是多种信号综合作用的结果。然而，当同一种信号作用于不同类型的细胞时，有可能产生不同的效应，例如，作为信号分子的乙酰胆碱可使骨骼肌细胞收缩，使心肌细胞松弛，使某些腺体细胞分泌。

蛋白质的磷酸化与去磷酸化在胞内信号传送中起着重要作用。胞内信号蛋白组成一个精细的信号网络，当信号传来时，系统中的成员将逐级地被磷酸化或去磷酸化，而蛋白的磷酸化与去磷酸化直接影响着它们的活性，这样将信号蛋白逐级激活而使信号传递。蛋白磷酸化通常有两种方式：一种是直接连接上磷酸基团，另一种是被诱导与 GTP 结合，蛋白磷酸酶可去除磷酸化位点上的磷酸基团，使蛋白回复到非磷酸化状态。信号分子到达细胞后可通过一系列信号转导分子传递信息，在这一过程中，首先是信号分子与受体结合。根据存在的部位不同，受体可分为胞内受体和细胞表面受体。胞内受体介导的信号传送有其自身的特点，首先是与这些受体结合的是一些小的疏水分子，只有这样的信号分子才能穿过细胞质膜进入胞内。胞内受体被激活的方式是当它们与信号分子结合后，便会与抑制其活性的蛋白相分离，由此而被激活，并暴露出与 DNA 结合的部位，受体进入胞核或有些受体本身就位于胞核，它们可启动相关基因的表达。目前认为作为重要胞内受体的甾类激素受体，在调节基因活化反应时包括两个步骤，首先是直接诱导少量基因转录，接着是这些基因产物反过来激活其他基因转录，这样，一种简单的激素诱导因子就在基因表达模式上引起复杂的变化。

细胞表面受体介导的信号传递，涉及到很多种类的信号分子对靶细胞的作用，根据其受体的特点可分为 4 种类型：①连接离子通道受体，这些受体的特点是既能与信号分子结合，本身又是离子通道的组成蛋白，信号分子的结合可调控这些通道的开与关。②连接 G 蛋白受体，此类受体研究得比较清楚，它们为一条 7 次跨膜的多肽链，胞外部分具有与信号分子结合的结合域，胞内部分具有激活异三聚体 G 蛋白的结构域。当受体被激活后，它们可将与其相连的异三聚体 G 蛋白激活，G 蛋白又将产生效应的靶蛋白激活。异三聚体 G 蛋白包括 α、β 和 γ 3 个亚基，通常 α 亚基与 GDP 结合，G 蛋白不表现出活性，当 α 亚基与 GTP 结合后便被激活。与连接 G 蛋白受体相关的胞内信号通路，目前知道得比较清楚的有两条，一条是 cAMP 信号通路，另一条是磷脂酰肌醇信号通路。前一条通路主要是 G 蛋白激活腺苷酸环化酶，使胞内 cAMP 浓度增加，当 cAMP 达到一定浓度时，可将蛋白激酶 A 激活，而蛋白激酶 A 再将其靶蛋白激活。后一条通路是 G 蛋白激活磷脂酶 C，磷脂酶 C 的激活一方面可使胞内 Ca^{2+} 浓度增加，进而调控胞内钙依赖性蛋白的活化；另一方面可将胞内的蛋白激酶 C 激活。这些方式都能将信号逐级传递，并诱导相应基因的表达。③酶连受体，此类受体均为跨膜蛋白，它们既作为受体与信号分子结合，自身又具有酶的活性。当受体被激活时，能作为酶行使功能。根据酶活化后催化反应的不同，又可将此类受体分为 4 种：a. 鸟苷酸环化酶受体，催化细胞质中 cGMP 的产生，而细胞中蛋白激酶 G 的活性依赖于 cGMP 的浓度；b. 酪氨酸蛋白激酶受体，将某些胞内信号传递蛋白特定的酪氨酸残基磷酸化，许多生长与分化因子的受体属于此种类型；c. 酪氨酸蛋白磷酸酶受体，将信号传递蛋白酪氨酸残基上的磷酸基团去除，此受体的活性保证了酪氨酸磷酸化仅在需要时存在，由此控制信号的传递，d. 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶受体，催化靶蛋白上的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化，转化生长因子 β 通过与此类受体结合调节细胞的增殖。④与酪氨酸蛋白激酶结合的受体，此类受体只有接受信号的结构域，缺少催化结构域，它们与无接受信号结构域的酪氨酸激酶相结合而发挥作用，其功能与酪氨酸蛋白激酶受体相似。

虽然细胞中各个信号通路具有各自的特点，但它们之间有着密切的联系，共同组成了一个完整的精细的相互协调的网络。对于这个网络的深入研究，将有助于对细胞各种生命活动的进一步认识。

思 考 题

1. 细胞间信号传递的方式有几种？各自具有哪些主要特点？
2. 试述蛋白磷酸化与去磷酸化在信号传递中的作用。
3. 分泌信号分子传递信号的方式有几种？各自具有的主要特点是什么？
4. 试述连接 G 蛋白受体介导的信号通路的特点。
5. 试述酪氨酸激酶受体介导的信号通路的特点。

参 考 资 料

1. 孙大业，郭艳林，马力耕编著. 细胞信号转导. 第 2 版. 北京：科学出版社，1998
2. 汪堃仁，薛绍白，柳惠图主编. 细胞生物学. 第 2 版. 北京：师范大学出版社，1998
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, *et al*. Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. New York & London: Garland

Publishing, Inc, 1994

4. Lodish H, Baltimore D, Bork A, *et al*. Molecular Cell Biology. 3rd ed. New York: Scientific American Books, 1995
5. Linder M E, Gilman A G. Proteins G. Sci Am, 1992, 267: 36～43
6. Harold V, Weinberg R A. Genes and the Biology of Cancer. New York: Scientific American Library, 1993
7. Lodish H, Berk A, Zipursky S L, *et al*. Molecular Cell Biology. 4th ed. New York: Scientific American Books, 2000
8. Bourne H R, Gilchrist A. Heterotrimeric G proteins. Curr Opin Cell Biol, 8: 189～196
9. Jaken S. Protein kinase C isozymes and substracts. Curr Opin Cell Biol, 8: 168～173
10. Alberts B, Bray D, Johnson A, *et al*. Essential Cell Biology. New York & London: Garland Publishing Inc, 1998

第11章

细胞的衰老与死亡

衰老与死亡是所有生物都存在的一种生命现象，也是重要的生命过程。它们可以从整体、器官、组织、细胞和亚细胞等不同层次表现出来，而细胞是生命结构和功能的基本单位，是各种生命活动赖以进行的基础，衰老与死亡首先是细胞以不同形式表现出来。

11.1 细胞的衰老

11.1.1 离体培养细胞的衰老现象

从单个离体细胞水平研究衰老现象是从不同年龄的个体取出细胞，在体外培养，观察该细胞能够增殖的代数，以此来判断该细胞的衰老程度。Hayflick 通过观察人的正常二倍体成纤维细胞在体外连续培养的状况，发现不论怎样完善培养条件，正常细胞的分裂增殖能力都是有限度的，不能无限分裂。细胞的分裂传代次数与细胞供体自身的年龄呈反比。取正常人胚胎的成纤维细胞传代培养，能分裂繁殖 40～60 代，如果取自青年人或老年人的成纤维细胞进行培养，细胞的分裂代数明显减少。采用几种动物做实验也得到近似的结果。可见细胞的增殖能力与供体的年龄有关。这种原来具有分裂能力的细胞随着整体年龄增长而减缓或停止分裂的现象叫做细胞衰老(senescence)。按照 Hayflick 的观点，细胞在失去分裂能力之前，细胞分裂传代整个过程所包括的时间是生物的生命极限在细胞水平上的表现。

生物机体的各种器官、组织和细胞的功能老化将导致生物整体水平的衰老。这种整体的衰老称为老龄化或老化(aging)，具有十分复杂的机制。研究人体水平老化发展了老年学(geronology)和老年医学的研究，从而为延缓或防止老化、延长人类寿命提供科学依据。机体的老(龄)化与细胞衰老虽然有密切的联系，但却是两个不同的概念。年老的生物有的器官和组织的细胞仍具有增殖能力，如精原细胞仍能增殖产生精子，造血干细胞一生都能增殖产生各种类型的血细胞。目前，细胞衰老与有机体的老龄化的确切关系还有待确定。

11.1.2 衰老细胞的变化

衰老的细胞在形态结构和生理生化反应上会出现明显的变化。

1. 细胞膜的变化

细胞膜结构的特征之一就是具有流动性，膜脂与膜蛋白可在膜中以一定方式流动，这是保证细胞膜正常功能的结构基础。衰老细胞的细胞膜结构发生变化，使膜的流动性减弱，脆性增加，这将明显影响到膜中蛋白质和脂类分子的生物学活性。细胞膜选择通透能力降低，对一些离子或分子进出细胞的控制力减弱，细胞膜上的受体分子减少，细胞质膜受损伤后不易修复，除此之外，受体与配体的亲和力、受体与配体结合后对信号的转导都发生一定程度的变化，以至于不能有效地接受和转导胞外信号。

细胞质膜的变化还影响到细胞间的连接和细胞间的相互作用，而这些对于细胞的正常生存是必不可少的。

2. 线粒体的变化

线粒体的变化在细胞衰老过程中是很重要的，细胞衰老时，一方面线粒体数目减少，另一方面线粒体的结构也发生变化，其内膜形成的嵴呈萎缩状。在低氧或缺氧的条件下，衰老细胞的线粒体更早地出现肿胀，接着形成空泡，最终线粒体破裂崩解。

由于线粒体数量的减少和结构的变化，细胞通过氧化磷酸化产生 ATP 的能力下降。此外，有实验表明衰老细胞的线粒体中，呼吸酶的活性下降。

3. 内质网的变化

内质网作为蛋白质和脂分子合成的重要场所分布在整个细胞中，特别是表面结合有核糖体的糙面内质网负责合成一些重要的蛋白质，例如，溶酶体中的酶。细胞衰老过程中，糙面内质网的量减少，内质网膜电子密度增高，膜结构变厚。此外内质网排列不规则，或出现肿胀和空泡。

4. 细胞核的变化

衰老细胞的核膜出现内折凹陷，而且细胞衰老程度越高内折越明显，核的整个体积变大，核中染色质凝聚、破碎，甚至出现异常多倍体。

5. 色素聚集

衰老细胞中出现色素聚集，主要是脂褐素的堆积。脂褐素是不饱和脂肪酸与氧发生化学反应的分解产物，是一种不溶性颗粒物。脂褐素来源于多种细胞器，尤其是线粒体、溶酶体和细胞膜等。膜结构中的不饱和脂肪酸与超氧化自由基起反应生成过氧化物，产生醛基和羧基，导致大分子交联，然后形成不溶性的脂褐素。不同的细胞在衰老过程中脂褐素堆积的量和速度是不同的，脂褐素颗粒的大小也有一定的差异。

上述的细胞衰老现象只限于大多数的正常体细胞(somatic line)，不包括发生转化的肿瘤细胞和正常的种系细胞。肿瘤细胞是失去增殖调控的细胞，其细胞连续不断地分裂和增殖，即获得了永生性的生长；正常的种系细胞(germ line)如造血干细胞、小肠上皮、舌粘膜、表皮、睾丸等细胞，终生维持分裂和增殖的能力。

11.1.3 细胞衰老的机制

细胞衰老的起因以及细胞衰老的启动与发展过程，是人们长期关注与研究的问题，众多研究者应用细胞生物学、分子生物学、遗传学、免疫学、生物化学、生理学等学科的知识和技术，对衰老机制进行了多角度、多层次的研究，大大推动了此领域的研究进展，并针对衰老机制提出了很多种假说，然而，至今还没有一种假说对衰老机制作出全面而合理的解释。现仅

就较为流行的假说做一个简要的介绍。

目前关于细胞衰老的分子机制，引起人们关注的有染色体端粒复制假说和线粒体自由基的假说。

11.1.3.1 染色体端粒复制假说

端粒是具有特殊 DNA 序列并以一种特殊方式复制的染色体末端结构。端粒是由简单的富含 T 和 G 的 DNA 片段的重复序列组成。人类端粒结构为染色体末端重复上千次的 TTAGGG 序列所组成。DNA 聚合酶不能完成线性染色体末端 DNA 的复制，也就是说在线性染色体复制时，DNA 聚合酶一定留下染色体末端的一段 DNA(一段端粒)使其不被复制。那么真核细胞染色体末端的端粒就会随着细胞分裂而缩短(图 7－20)。这个缩短的端粒传给子细胞后，随着细胞的再次分裂进一步缩短。这样，染色体末端端粒随着每次细胞分裂而逐渐缩短，直至影响分裂走向衰老。

人类种系细胞一生中维持分裂、不断增殖的原因是该细胞表达端粒酶。端粒酶以自身一段 RNA 为模板，通过逆转录出一段端粒片段并使之连接于染色体的端粒末端，使端粒不缩短，维持完整，从而保持了细胞的永生化生长。在单细胞生物、多细胞生物的种系细胞中都显示弱的端粒酶活性，而在人类正常组织的体细胞均无端粒酶活性。在大多数恶性肿瘤细胞中明显的端粒酶活性使肿瘤细胞具有永生性生长的特性。

1996 年 7 月 5 日全世界第一只克隆羊多莉(Dolly)在苏格兰的罗斯林研究所诞生了。它是由成体山羊乳腺细胞核移植到去掉细胞核物质的山羊卵中使之融合克隆出来的。由于用的是成体山羊乳腺细胞核，经检测多莉细胞中染色体端粒比正常的同龄山羊的端粒短 20%左右，所以有人称多莉是“披着小羊皮的老羊”。至于端粒的缩短和增殖能力减弱是否是引起细胞衰老的主要原因，还需要更多的证据来证实。

11.1.3.2 线粒体自由基假说

线粒体是细胞内的动力工厂，自由基是高活性分子(通常由氧产生)，在其外围常有不配对的电子。这种状态的分子遇到任何化合物倾向破坏性的氧化。

线粒体产生 ATP 为细胞内进行的大多数生命过程如跨细胞膜的离子泵、肌肉收缩、蛋白聚集等提供能量。ATP 合成是一个非常复杂的反应过程，主要是由包埋在线粒体内膜中的一系列的分子复合物，借助 O_2 从营养物获取能量制造 ATP。不幸的是线粒体从营养物中获取能量的同时作为副产物产生自由基。细胞中许多自由基是由线粒体制造出来的，比如超氧自由基 $O_2^{\cdot -}$(点代表不配对的电子)，$O_2^{\cdot -}$ 本身有破坏作用，还能转变成 H_2O_2。虽然 H_2O_2 不是自由基但可形成氢氧自由基($OH^{\cdot -}$)。

自由基一旦形成就能损伤细胞内的蛋白质、脂类和 DNA，其中线粒体中合成 ATP 的呼吸链中的各种组分、线粒体 DNA、线粒体内膜以及线粒体的核蛋白体更易受到自由基的损伤(图 11－1)。这是因为线粒体 DNA 处于自由基产生的邻近部位，易被氧化攻击，此外线粒体 DNA 不像核中 DNA 那样与蛋白质结合受到一定的保护，因而线粒体 DNA 比核 DNA 更易受氧化损伤。

线粒体自由基假说认为，自由基引起的线粒体损伤最终干扰了 ATP 产生的效率并增加了自由基的输出，自由基加速了线粒体组分的氧化损伤，因而进一步抑制了 ATP 的产生。同时，由于线粒体增加了自由基的输出，故加剧了对线粒体以外的组成成分的攻击，从而进

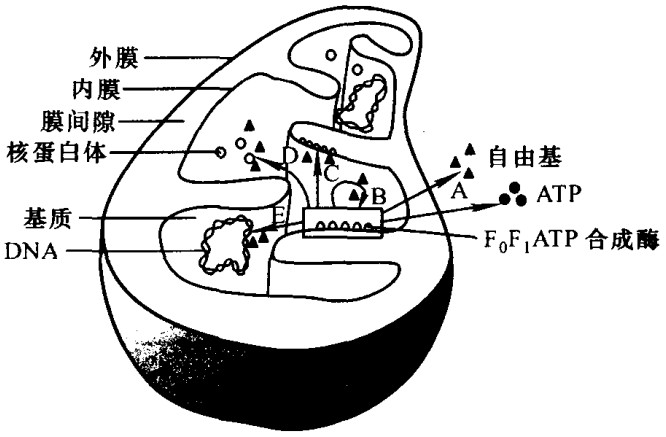


图 11－1 线粒体自由基假说示意图
A. 自由基进入细胞质基质，使其他部位膜结构受损；B. 自由基影响电子传递系统，ATP 合成受阻；C. 自由基使线粒体膜中不饱和脂肪酸发生过氧化反应，使膜形态结构受损；D. 自由基破坏核蛋白体的结构使之解聚；E. 自由基损伤线粒体 DNA，使之突变

一步损伤了细胞的功能，随之，由细胞组成的组织和器官的功能逐渐衰退，机体不能应付稳定性的挑战。机体虽然具有一定的抵消氧化剂影响的能力，比如细胞产生抗氧化酶能解除自由基的毒害，细胞制造的其他酶也能修复氧化损伤，但是，损伤还是随着时间延续而不断累积。

11.1.4 细胞衰老研究的常用方法

用细胞培养的方法可以研究衰老过程中细胞的分化与分裂的特征，正常细胞功能的衰退与细胞分裂次数的关系；分析一些因子对细胞的生理和病理衰老过程的影响。还可利用体外培养细胞寿命研究和寿命预测试验，以及细胞融合和细胞杂交等方法，研究细胞衰老机制。这些体外培养的细胞包括成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、人胚胎肺细胞、软骨细胞、肝细胞、神经细胞等。

采用分子生物学和物理化学分析的方法研究，衰老过程中分子、酶和细胞内某些物质的变化，线粒体的氧化磷酸化的变化，高能物质的合成能力，脂褐素含量的测定，过氧化脂质、超氧自由基和过氧岐化酶的作用，生物膜的变化，受体密度和受体亲和力及信号转导过程对衰老的影响，蛋白质、DNA 大分子的交联对衰老的影响，蛋白质的合成、核酸的复制（正常的和有差错的复制）对衰老的影响。

近 20 年来，科学家们十分重视遗传物质与衰老的联系，试图分析基因损伤、基因修复、基因突变对衰老的影响和作用。有的研究者试图分离衰老基因、死亡基因或长寿基因，在不同程度取得重要进展。例如，M. R. Rose 对黑尾果蝇的各种形状基因进行深入分析，用选育法培养出强壮果蝇、能制造出更多的过氧岐化酶基因的果蝇，其寿命比其他果蝇长约一倍。线状染色体末端的特殊结构端粒对维持染色体稳定重要作用的研究，也属于此领域一个重要方面。基因分析是衰老研究中的极其重要和活跃的领域。

11.2 细胞的死亡

11.2.1 细胞坏死与细胞凋亡的比较

细胞的死亡，顾名思义是指细胞生命活动的结束。在多细胞生物中，细胞的死亡有两种不同形式：一种是坏死（性）或意外（性）死亡（necrosis），它是由某些外界因素比如局部贫血、

高热以及物理、化学损伤和生物侵袭等造成细胞急速死亡，是一种被动性死亡；另一种称之为程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)，是由基因控制的自杀程序引起的主动性死亡，主要发生在胚胎发育过程中。例如，鼠的爪在胚胎发育过程中的成形，起初是一种类似铲状的结构，只有当爪间的细胞发生程序性细胞死亡后爪才能分开(图 11－2)，其实人的手和足在胚胎发育过程中的成形也与鼠类似；又如在蝌蚪发育成蛙的变态过程中蝌蚪尾部细胞的死亡；再如胚胎中产生大量的神经细胞，在发育过程中神经细胞以死亡的方式调节细胞的数目以达到与其靶细胞匹配的神经分布。

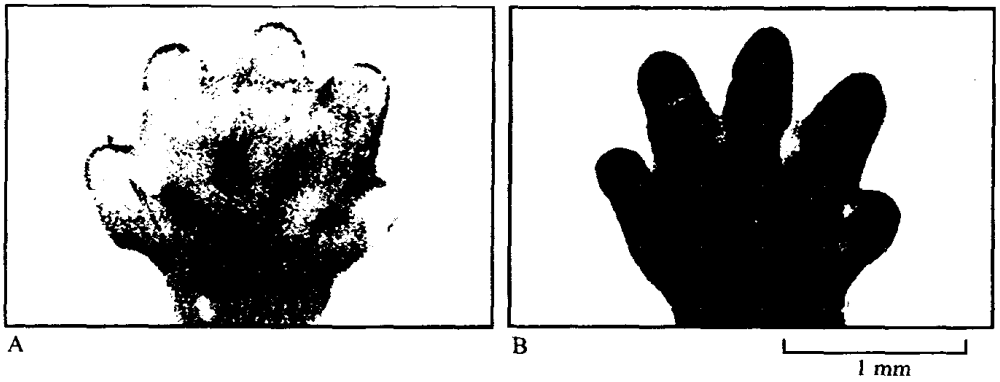


图 11－2 鼠爪趾间细胞在胚胎发育过程中发生程序性细胞死亡

A. 趾间细胞正在发生程序性细胞死亡的形态；B. 部分趾间细胞发生程序性细胞死亡后的形态(引自 M.D.Jacobson, 等)

成体是否也发生类似的细胞自杀现象呢？直至 1972 年 Kerr 等在结扎大鼠肝门静脉的实验中除发现大量坏死细胞以外，还发现了一些分散的肝细胞变成圆形的原生质小团，其中一些还含有高凝集的染色质颗粒，这些看来都是死亡的特征，但小团块中溶酶体未被破坏，它们与细胞坏死不同。说明这两类细胞死亡过程中细胞形态有明显的差别。因此，他们建议称这类死亡为细胞凋亡(apoptosis，来自希腊语，意思是像花瓣或树叶落下)。可以认为细胞凋亡显现的是程序性细胞死亡的形态和生化特征。现在一般把细胞凋亡和程序性细胞死亡相等同。

细胞坏死和细胞凋亡在形态学和生物化学上有着明显的差别。细胞坏死是意外性、被动性的死亡；而细胞凋亡则是在胚胎发育过程中程序控制的死亡，或者是由于凋亡受体活化、缺少血清、受到辐射或化学药物诱导的细胞主动发生的自杀行为，这个过程是需要消耗能量的。

从形态学和生化特征方面看，坏死细胞出现细胞膨胀，细胞质膜裂解，细胞器膨大，溶酶体破裂，水解酶释放到细胞溶质中使细胞内容物分解导致细胞崩解，DNA 随机裂解成不规则的碎片，引起炎症，巨噬细胞和白细胞聚集在坏死细胞处并吞噬坏死细胞的碎片(图 11－3A)。凋亡细胞最主要的特征是细胞不膨胀，保存细胞内部结构，使正常分散的染色质凝集在细胞核被膜内侧呈环状或块状(图 11－3B、C)，核酸内切酶活化使核小体之间的连接处断裂，裂解成长短不同的 DNA 片段，其长度为 180～200 bp 及其整数倍，通过 DNA 电泳可观察到梯状电泳图谱(图 11－4)。凋亡细胞的细胞质膜完整，这一点可用染料排斥实验检测出来，细胞器基本维持原状，细胞质膜和核被膜出泡，有时出泡的部分缢缩成凋亡小体并与

细胞分开，凋亡小体中含有部分凝集的染色质。凋亡细胞被巨噬细胞或其周围的细胞吞噬、消化而不出现炎症。

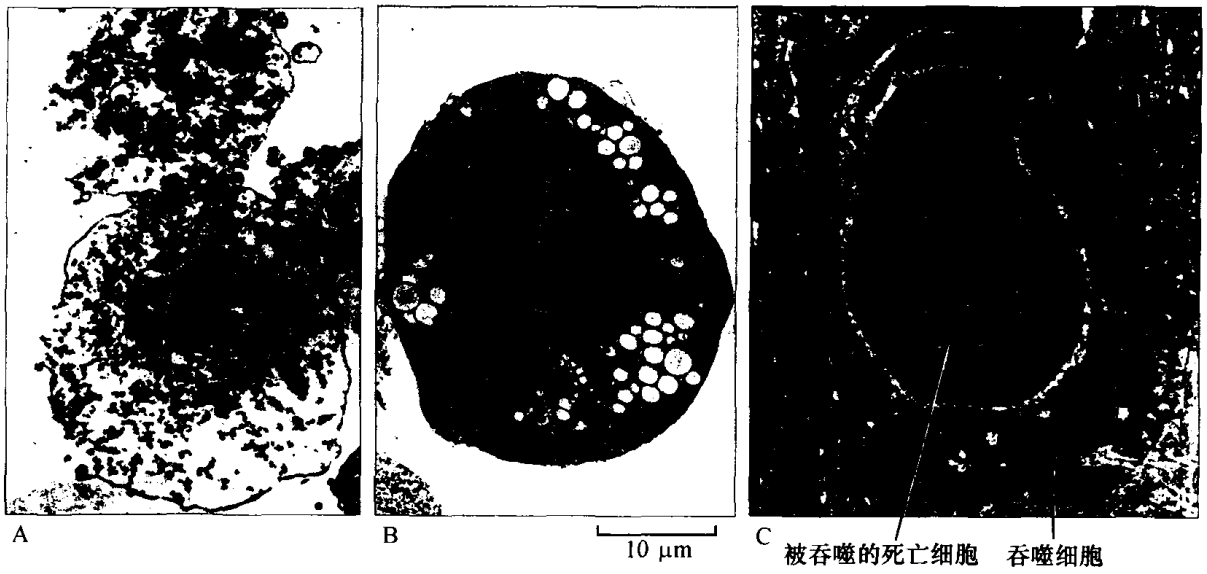


图 11－3 细胞死亡的电镜照片

A、为坏死；B、C. 为凋亡；A 和 B. 是体外培养细胞的死亡；C. 为发育组织中的细胞凋亡，可见凋亡细胞被邻近的一个细胞吞噬。A. 坏死细胞崩裂；B 和 C. 凋亡细胞浓缩，看来细胞相对完整；B. 凋亡细胞中的大空泡不是在所有凋亡细胞中都存在(引自 Julia Burne)

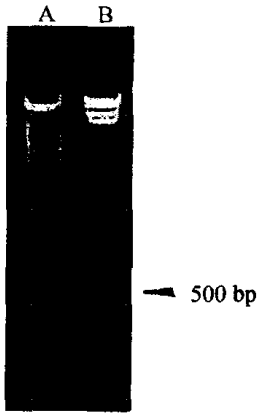


图 11－4 细胞凋亡诱导核小体间的接头(linker)处断裂，形成长度为 180～200 bp 及其整数倍的片段，在 DNA 电泳中形成梯状条带

A. 为凋亡细胞的 DNA 电泳图，可见长度为 180～200 bp 及其整数倍的片段；B. 为正常细胞的 DNA 电泳图，未见 DNA 断裂的片段

11.2.2 细胞凋亡的生物学意义

细胞凋亡与细胞分裂、分化一样是最基本的生命现象，是机体生存和发育的基础，它涉及到生命活动中的许多领域。

在胚胎发育至某个阶段，特定区域的细胞群就发生自然凋亡，清除这些细胞有利于器官的形态发生。脊椎背根运动神经元开始时数目很多，当所支配的肌肉发育相对恒定后，约一半运动神经元相继凋亡，清除多余神经元以利于神经肌肉间匹配；再如肢体发生中，早期的手和足形似桨板，只有当某些多余细胞凋亡后，才能形成正常的指和趾。如果没有程序性死亡，机体的胚胎发育则不能正常进行。

在研究病毒感染和肿瘤时，发现一些病毒感染的细胞、肿瘤细胞可通过凋亡的方式消除，衰老的细胞也可通过凋亡的形式加以清除。凋亡在正常的细胞生存与死亡的平衡中起

调节作用，如果该平衡出现问题则引起肿瘤、阿尔兹海默病、AIDS 和类风湿关节炎等疾病的发生。相信随着对凋亡分子机理的深入研究，人们定将会采取科学措施控制（促进或抑制）细胞凋亡，造福人类。

11.2.3 细胞凋亡的分子机制

11.2.3.1 线虫的细胞凋亡相关基因

秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*）是研究细胞凋亡的理想模型，因为每条线虫都无一例外地包括 1 090 个体细胞，其中 131 个在发育中发生程序性死亡；此外，线虫整个身体呈透明状，易于观察。通过研究现已从线虫中分离出十几种细胞凋亡相关基因。其中研究得比较深入的基因是 *ced* －9、*ced* －3 和 *ced* －4。*ced* －9 抑制细胞凋亡，与人的 *bcl* －2 基因有同源性。这说明凋亡相关基因在进化上是很保守的，提示可以从线虫凋亡机理中认识人类细胞凋亡的机制。*ced* －3 和 *ced* －4 则促进细胞凋亡，*ced* －4 编码一种 6.3×10^4 蛋白，哺乳动物细胞中与之同源的基因是 AP－1。*ced* －3 与哺乳动物细胞中的 caspase 基因具有同源性。推测在线虫细胞中 *ced* －3、*ced* －4 和 *ced* －9 的平衡从两个相反的方向调节细胞的生存状态。

11.2.3.2 胱天蛋白酶与细胞凋亡

胱天蛋白酶（caspase）是一类天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶（cysteine aspartic acid specific protease），人的细胞中已发现十几种 caspase，大多数都在细胞凋亡中起作用。根据 caspase 在级联活化中的位置，可将哺乳动物的 caspase 家族分为两类，上游的起始 caspase（类型 1）如 caspase 2, 8, 9, 10 等和下游的效应 caspase（类型 2）如 caspase 3, 6, 7, 14 等。caspase 所有成员都具有共同的特点，其活性中心是半胱氨酸残基，水解蛋白底物的位点是 Asp－X，即将底物中天冬氨酸残基之后的键断裂。caspase 底物特异性决定于断裂位点天冬氨酸一侧的 4 个氨基酸序列，例如，caspase 3 识别 Asp－Glu－Val－Asp，caspase 6 识别 Val－Glu－Ile－Asp 等。caspase 家族在正常条件下，以相对分子质量 $3.0\times10^4\sim5.0\times10^4$ 的非活化的酶原形式存在于细胞中，它们具有 4 个独特的结构域，N 端的前结构域、大亚基区域、小亚基区域以及大小亚基区域间的连接区域。当酶原被活化时，各个结构域之间发生裂解，两个大亚基和两小亚基的区域形成四聚体复合物。caspase 的级联反应在调节和执行凋亡的过程中发挥核心作用。

11.2.3.3 *bcl* －2 与细胞凋亡

bcl －2 属于细胞凋亡抑制基因。它最初是从人的滤泡性 B 细胞淋巴瘤中分离出来的，通常它定位于人的第 18 号染色体，但由于发生染色体易位，使 *bcl* －2 与 14 号染色体上 *IgH* 基因并列导致过度表达，*bcl* －2 含 3 个外显子，经剪接产生两个开放阅读框，分别编码 *bcl* －2α 及 *bcl* －2β 蛋白。*bcl* －2 不同于一般意义上加速细胞增殖而致癌的癌基因，它是通过抵抗多种形式的细胞死亡，延长细胞寿命，使细胞数目累积增多来促进肿瘤形成的。

bcl －2 在细胞凋亡的调控中起重要作用，目前已发现哺乳动物细胞中 *bcl* －2 家族包括十几个成员，按其对凋亡的调节功能可分为抗凋亡成员（如 *bcl* －2、*bcl* －*xl* 等）和促进凋亡成员（如 Bax、Bid 等）。通过对 *bcl* －2 家族成员的序列分析，已知它们存在有 4 个保守的 *bcl* －2 同源结构域：BH1、BH2、BH3、BH4。有些成员含有全部的 BH 结构域，如 *bcl* －2、*bcl*

$-xl$ 等，有些成员含有 BH1、BH2 和 BH3 结构域，如 Bax、Bak 等，而 Bid 只含 BH3 结构域。此外，除了 Bad 和 Bid 以外，大多数 *bcl* -2 家族成员的 C 端含有 20 个氨基酸残基组成的疏水跨膜结构域，它们可籍此结构分布于线粒体膜上。

已有足够的实验证实 *bcl* -2 是哺乳动物普遍存在的“长寿”基因。正常人体组织中生存期长的细胞如脑神经元表达 *bcl* -2 水平高于其他细胞。用 EB 病毒蛋白刺激 B 细胞中 *bcl* -2 的表达增高，可抑制 EB 病毒感染所致的细胞凋亡。将 *bcl* -2 基因转入前 B 细胞以及多种造血细胞，表明获得 *bcl* -2 高表达的细胞能够延长在诸如去除生长因子、受到 γ 射线照射等逆境下的存活期限。*bcl* -2 还可抑制 *c* $-$ *myc* 和 *p*53 等基因诱导的细胞凋亡。在转基因小鼠中发现 *bcl* -2 的高表达引起动物淋巴组织因凋亡受抑制而导致的异常增生，对过度增殖的淋巴细胞进行体外培养证实其寿命较正常淋巴细胞明显延长。当然，并非所有情况下的细胞凋亡都被 *bcl* -2 基因所控制，提示细胞凋亡可能有更多的基因共同参加。

11.2.3.4 *p*53 基因与细胞凋亡

Lane 等人于 1979 年在研究 SV40 病毒转化的细胞时，发现一种与 SV40T 抗原紧密结合的相对分子质量约 5.3×10^4 的细胞蛋白，当初还不清楚其结构与功能，将其称为 p53 蛋白。1984 年 Benchimol 等人，首先克隆出了小鼠的 p53 cDNA，随后，以此为探针克隆出人的 p53 cDNA。*p*53 基因定位于人的 17 号染色体上，横跨 16～20 kb 的一段 DNA 序列。*p*53 基因由 11 个外显子组成，第一个外显子没有蛋白质编码功能，而且距第 2 个外显子有 8～10 kb 之遥。经过比较发现，在进化过程中，*p*53 基因具有高度保守性。随着对 *p*53 基因结构、蛋白结构及功能的不断研究，对 *p*53 基因表达的调控机制及功能的认识越来越深入。

*p*53 基因是典型的肿瘤抑制基因，对细胞生长起负调节作用，它具有促使细胞凋亡的功能。p53 野生型蛋白正常条件下是一种不稳定的调节蛋白，其半衰期仅有 15～30 min，因此正常细胞中几乎检测不到 p53 蛋白的表达。当细胞中的 DNA 受到损伤以后，p53 蛋白出现聚集现象，由此诱导细胞出现细胞周期的 G_1 期阻断，并进一步导致细胞凋亡。*p*53 基因纯合变异的细胞，在受到射线损伤后，由于其蛋白产物失去原有的功能而不能使细胞出现凋亡。

11.2.3.5 *c* $-$ *myc* 基因与细胞凋亡

c $-$ *myc* 是一个具有多重功能的癌基因，位于人的第 8 号染色体上，有 3 个外显子，编码产物 $p62^{c-myc}$ 蛋白，位于细胞核内，具有转录因子活性。c－Myc 蛋白分子上具有拉链和螺旋－环－螺旋结构域，通过同二聚体或异二聚体形式与 DNA 调节元件结合调控特定基因的转录。它的表达具有促进细胞增殖、抑制细胞分化和参与细胞凋亡等作用。现认为 *c* $-$ *myc* 是细胞凋亡的关键因素之一。Evan 等把 *c* $-$ *myc* 基因导入大鼠纤维母细胞 yat－1 中让其表达，证明了 *c* $-$ *myc* 在细胞凋亡中的作用：*c* $-$ *myc* 低水平时，细胞生长停滞；*c* $-$ *myc* 表达增高，且有血清生长因子存在时，培养细胞进入增殖状态；*c* $-$ *myc* 表达增高，而无生长因子时，细胞发生凋亡，而且 *c* $-$ *myc* 水平越高，细胞对生长因子的依赖性越强，出现血清饥饿时细胞凋亡也越明显。*c* $-$ *myc* 可与 *bcl* -2 协同转化细胞，*bcl* -2 可抑制 *c* $-$ *myc* 所致的细胞凋亡，但不影响 *c* $-$ *myc* 促有丝分裂增殖的作用。

11.2.3.6 哺乳动物细胞中主要的凋亡通路

目前在哺乳动物细胞中了解的比较清楚的凋亡通路有两条，一条是细胞表面死亡受体

介导的细胞凋亡，另一条是以线粒体为核心的细胞凋亡(图 11－5)。

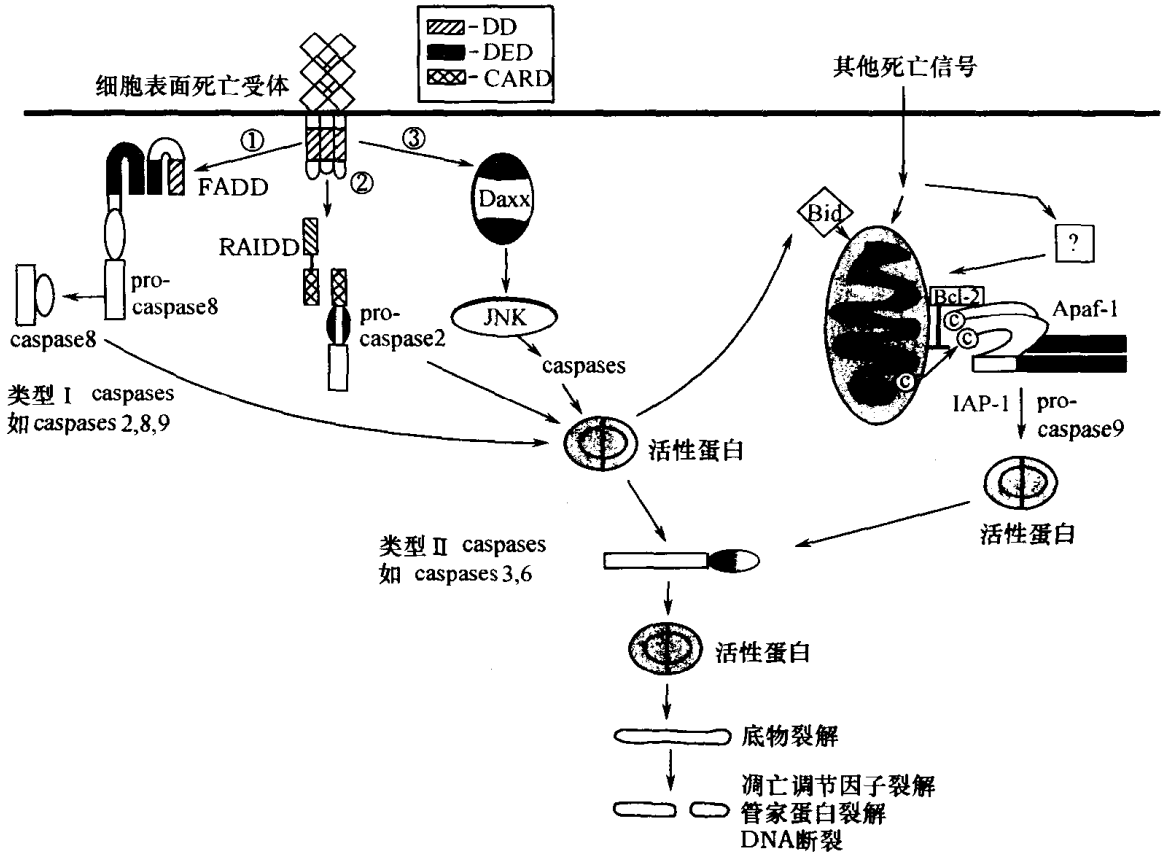


图 11－5　哺乳动物细胞凋亡的主要通路

哺乳动物细胞表面死亡受体是一类跨膜蛋白家族，属于肿瘤坏死因子(TNF)/神经生长因子(NGF)受体超家族，其主要成员有 TNFR－1，CD95/Fas/APO－1，DR－4/TRLAL－R1，DR－3/APO－3/WSL－1/TRAMP，DR－5/TRAIL－R2/TRICK－R1/KILLER 等。这些跨膜受体蛋白在序列上具有同源性，它们的胞外部分都具有一个半胱氨酸富集的重复区。TNFR－1 和 Fas 的胞质部分具有一个同源的约含 68 个氨基酸的死亡区域(death domain，DD)。

活化细胞表面死亡受体的配体属于 TNF 超家族，其成员中 TNF 与 TNFR－1 结合，CD95/Fas 配体与 Fas 受体结合，APO－3 配体与 DR－3 结合，APO－2 配体与 DR－4 和 DR－5 结合。配体与受体结合后，受体构象发生变化并聚合成三聚体，受体三聚体可通过死亡区域与胞内同样具有死亡区域的受体结合蛋白相结合，或与不具有死亡区域的接头蛋白相结合。具有同源死亡区域的受体结合蛋白包括 FADD/MDRT1(Fas associated protein with death domain)，TRADD(TNFR associated death domain)，RIP(receptor interacting protein)，RAIDD 等。不含死亡区域的接头蛋白有 DaxX(CD95 death domain associated protein)。以 FADD/MORT1 为例，当它的死亡区域从受体上接受死亡信号后，通过 N 端的 DED(death effector domain)诱导含有两个 DED 的 procaspase 8 蛋白自我水解活化为 caspase 8，活化的 caspase 8 进一步裂解下游底物。

RAIDD 除了含有 DD 外，还含有 CARDD(caspase recruiment domain)，它可诱导同样具

有 CARDD 的 procaspase 2 活化，进而活化下游的 caspase，产生级联反应。接头蛋白 DaxX 虽不含 DD，但可与 TNFR－1 或 CD95 的 DD 结合，被活化后可通过 Jnk/Sapk 进一步活化下游的 caspase。以上几种方式都可导致细胞凋亡。

在以线粒体为核心的凋亡通路中，死亡信号使细胞色素 c 从线粒体释放到胞质作为通路的起始，释放的细胞色素 c 与胞质中的 dATP 和 Apaf－1 结合，诱导 procaspase 9 活化，进而活化 procaspase 3，并最终导致细胞凋亡。

Apaf－1 是一种相对分子质量为 1.3×10^5 的蛋白，包括 3 个功能区域：①N 端的 85 个氨基酸残基与某些 caspase（如 caspase 1，2，9）具有同源性，该区域又称 CARD，可与 caspase 的 CARD 结合；②CARD 之后一段 320 个氨基酸残基的区域与 *ced*－4 同源；③C 端包括 12～13 个 WD－40 重复，WD－40 为介导蛋白与蛋白相互作用的结构。

caspase 3 作为 *ced*－3 的同源物，通常以 3.2×10^4 的非活化酶原形式存在胞质中，当细胞发生凋亡时，procaspase 3 被活化，裂解产生 2.0×10^4 和 1.2×10^4 两个亚基，组成 $\alpha_2\beta_2$ 的四聚体活化酶。caspase 3 是两条通路的交汇点，当它被活化后，一方面催化更多的 procaspase 3 或其他 procaspase 活化，另一方面降解一系列底物，导致细胞结构或功能蛋白降解，促使细胞凋亡。

bcl－2 家族成员是线粒体介导的凋亡通路中的关键调节者。目前推测 *bcl*－2、*bcl*－xl 等抗凋亡成员通过维持线粒体结构与功能的稳定性，还可能与细胞色素 c 相结合，直接或间接抑制线粒体释放细胞色素 c，因而抑制细胞凋亡。而一些促进凋亡成员如 Bax 则通过改变线粒体膜透性促使细胞色素 c 从线粒体释放。而只含有 BH3 结构域的 Bid 被 caspase 8 裂解激活后，其含有 BH3 结构域的片段可直接诱导细胞色素 c 释放，导致细胞凋亡（见封面图）。当细胞中存在的促凋亡成员的量较大时，将促进细胞凋亡，当细胞中抗凋亡成员过多时，细胞便具有抗凋亡特性，因此，细胞内促凋亡与抗凋亡成员的比例在一定程度上成为决定细胞生死的关键。另一类在以线粒体为核心的凋亡通路中起了调节作用的因子是 IAP（inhibitor of apoptosis），它能与 procaspase 结合而阻止其活化，或直接抑制活化的 caspase 的催化活性，从而抑制细胞凋亡。

凋亡是一个极其复杂的生命过程，以上介绍的通路仅仅提供了凋亡进程的两条主要线索，对不同种类细胞，或不同凋亡因素作用而言，可能还平行存在着另外的凋亡通路。即使这两条通路自身，也可能相互影响、协同作用。例如死亡受体通路被激活，活化的 caspase 8 可迄今为止，人们对凋亡的分子机制虽已有所了解，但还有许多问题尚未阐明，有待进一步探索，相信不久的将来定能揭开它的神秘面纱。

内 容 提 要

生命从诞生到死亡存在着一个衰老的过程，细胞是生物形态结构和生命活动的基本单位，衰老必然会在细胞水平上表现出来。衰老的细胞在形态结构和生理生化反应上会出现明显的变化：①细胞质膜的变化，主要是组成膜的蛋白质和脂类分子的流动性减弱，脆性增加，膜的选择性降低，并且受到损伤后不易修复；②线粒体的变化，一方面线粒体数目减少，另一方面线粒体结构也发生变化，通过氧化磷酸化产生 ATP 的能力下降；③内质网的变化，粗面内质网的量减少，一些重要蛋白质的合成受到影响；④细胞核的变化，核膜出现内折凹

陷，核中染色质出现凝集、破碎现象；⑤色素聚集，主要是脂褐素的堆积。

关于细胞衰老的分子机制，现已提出多种假说，目前较受关注的有：①染色体端粒在复制中不断缩短，端粒的缩短将导致细胞衰老；②线粒体自由基假说，线粒体在从营养物中获取能量制造 ATP 的同时，产生自由基，自由基一旦形成就能损伤细胞内的蛋白质、脂类和 DNA，尤其是线粒体中的蛋白质、脂类和 DNA。

细胞的死亡意味着细胞生命的终止，细胞死亡有两种不同形式：①细胞坏死，它是由某些外界因素造成的细胞急速死亡，是一种被动性死亡；②细胞凋亡，这是一种由特定基因控制的主动性死亡。细胞坏死与细胞凋亡在形态学和生物化学上有着明显的区别，坏死的细胞，其细胞质膜破裂，细胞器膨大，溶酶体破裂，水解酶释放到细胞质中，导致细胞崩解，DNA 裂解成不规则的碎片等；而凋亡的细胞，其膜结构基本完整，但正常分散的染色质凝集，核酸内切酶活化并在核小体之间的连接处将 DNA 切断，通过电泳可看到以 180～200 bp 为基本长度单位的片段。

细胞凋亡有广泛的生物学意义，主要在胚胎发育时期清除多余的细胞，有利于器官的建成。当细胞被病毒感染或发生癌变时会通过凋亡的方式加以消除。关于凋亡的机制目前已确定了一些凋亡相关基因，如线虫中的 *ced* －3、*ced* －4 和 *ced* －9 等，哺乳动物细胞中的 *caspase*，*bcl* －2，*p53*，*c* －*myc* 等，细胞凋亡的启动及发生过程已有一些研究结果，目前在哺乳动物细胞中了解得比较清楚的凋亡通路有两条，一条是细胞表面死亡受体介导的细胞凋亡，另一条是以线粒体为核心的细胞凋亡。但是对于细胞凋亡的机理还有许多未解之谜，相信细胞凋亡将会继续成为细胞生物学领域中的研究热点。

思 考 题

1. 简述细胞衰老的主要特征。
2. 试比较细胞坏死与细胞凋亡的主要不同点。
3. 简述细胞凋亡的生物学意义。

参 考 资 料

1. 张蘅，童坦君主编. 医学分子物学. 北京：北京医科大学出版社，1999. 661～694
2. Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell, 1997, 88: 355～365
3. Liu X, Li P, Piotr W, *et al*. DNA fragmentation factor DFF40 induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 1～6
4. Liu X, Zou H, Slaughter C, *et al*. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase－3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. Cell, 1997, 89: 175～184

第12章

细胞的起源与演化

细胞的起源与演化，是现代自然科学尚未完全解决的重大问题。随着科学的进步，科学家又提出了一些新的看法和推测，本章将对此作些扼要的介绍。

12.1 从分子到原始细胞

12.1.1 原始地球的条件

20世纪70年代以前，人们一般认为，地球上生命的出现不会早于30亿年前，认为当时地球表面的温度已逐渐降低，气候温和。根据远离太阳、变化较小的木星、土星它们现在的大气成分主要是 CH_4、NH_3 和 H_2 的事实，推想原始地球的大气也是这样的强还原性大气。在实验室内用真空放电、紫外线照射（模拟原始地球的自然能源）等作用于这样的还原性气体，能生成包括多种氨基酸在内的种种有机物。人们设想，原始地球的情形也是如此。这些有机物被雨水冲淋到原始海洋中，经过长期的化学进化，有机小分子可以变成生物大分子；生物大分子可以变成能表现出一些生命现象的多分子体系即原生体（protobion），最后由原生体发展为原始细胞（progenote）。最初的原始生物是异养的（heterotrophic），以原始海洋中的有机汤为养料，后来才发展出营光合作用的自养生物（autotrophic organism）。以上就是20世纪70年代以前科学界对生命起源即从分子到原始细胞的一般观点。但是，其后发现的一些科学事实，开始改变人们的上述看法。首先，20世纪70、80年代在澳大利亚西部诺思波尔（North Pole）地区发现了35亿年前的、可能是蓝藻（蓝细菌）类的丝状微化石（filamentous microfossil）（图12－1），它们由多个细胞组成，形态已较复杂，不可能突然出现，需要有一

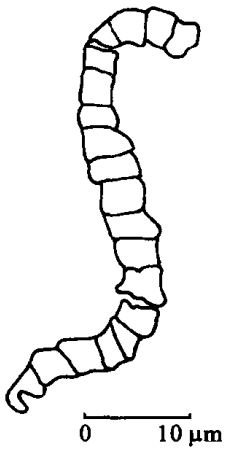


图12－1　35亿年前的丝状微化石（自J. W. Schopf, 1992）

段较长的进化时间；其次，近年通过检测稳定碳同位素的比值($\delta^{13}C$)* 发现，格陵兰伊苏亚(Isua)地区和阿基利亚岛(Akilia Island)38 亿年前的沉积岩中，已有生物有机合成的遗迹。由此推测，生命起源很可能在 40 亿年前就已经发生了，那时离地球形成(46 亿年前)不远，地壳刚形成不久，陨石和彗星还常常轰击地球，温度极高；到处火山爆发，喷出的气体主要是 CO_2、N_2 和水蒸汽，即使有少量的 CH_4 和 NH_3 放出，也立刻被高温和极强的紫外线分解为 CO_2 和 H_2 及 N_2 和 H_2，而游离的 H_2 很快就会逃逸到太空中去。因此，原始地球的大气不可能是强还原性大气，而更可能是由 CO_2、CO、N_2 和水蒸汽组成的、氧化还原上近乎中性的大气。自然能源作用于这样的大气是不会产生出有机物和氨基酸的。那么，生命的原料可能来自何处？生命又可能在何处产生呢？

12.1.2 星际分子和深海热泉

天文学家利用射电望远镜和其他先进技术，迄今已发现宇宙间有近百种星际分子(interstellar molecule)，它们中多数是有机化合物。有些星际分子如氰(HCN)、甲醛(HCHO)、氰基乙炔(HC≡C－C≡N)等还是合成蛋白质、核酸和糖类"元件"的重要原料。星际分子通常冻结在极细的星际尘埃上(图 12－2)。星际尘埃的核心由一硅质颗粒组成，直径不到 1μm，年龄与太阳系相当。最初冻结在尘埃之外的水、氨、二氧化碳等无机分子，经受了长期的紫外辐射，不但可能形成为醛、醇、有机酸和腈类等有机分子，而且还可能生成象氨基酸那样的生化分子(据报道，1994 年美国的射电天文学家通过频谱在靠近银河中心的某星云中就发现了氨基酸)，其机理是无机分子在紫外辐射的作用下，化学键先断裂，然后再重新组成种种复杂的化合物。早期可能已有大量的星际尘埃进入了地球，它们所带来的有机分子参与了原始地球的化学进化(chemical evolution)**。有的陨星(meteorite)碎片如碳质球粒陨石(carbonaceous chondrites)也含有有机分子。彗星(comet)是太阳系周围的早期凝聚物，含有大量水分和有机物。它们通过撞击地球也可能将水和有机物带到地球上来，成为导致生命起源的原材料。

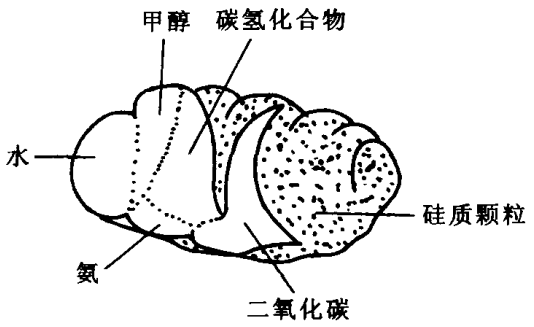


图 12－2 星际分子冻结在星际尘埃—硅质颗粒—上的示意图(仿 M. P. Bernstein, 1999)

20 世纪 70 年代末，科学家在东太平洋和加拉帕戈斯群岛附近的洋嵴上，发现了几处深海热泉(submarine hot spring)。这些热泉养活着包括管栖蠕虫、蛤类和细菌在内的兴旺的生物群落。迄今已查明世界上有数十处这样的深海水热喷口(hydrothermal vent)，大都位于大洋深处板块边缘水深 2 000～3 000 m 的洋嵴上。海水和洋嵴下的岩浆之间，有物质和热

---

* 碳有^{12}C、^{13}C、^{14}C 3 种同位素，其中^{12}C 和^{13}C 为稳定同位素，植物在光合作用中较多地利用^{12}C，^{12}C 就较多地被浓缩到植物体中。以植物为生的动物体内也相应地含有较多的^{12}C。因此，测定$^{13}C/^{12}C$ 的比率，就可推测被测样品是否属于生物起源。以含^{13}C 最多的海相碳酸盐作标准样品，通过下式就可求出^{13}C 的亏损值($\delta^{13}C$)：

$$\delta^{13}C = \frac{\text{样品的}(^{13}C/^{12}C) - \text{标准的}(^{13}C/^{12}C)}{\text{标准的}(^{13}C/^{12}C)} \times 1\,000$$

$\delta^{13}C$ 越是负值，说明^{13}C 越少，即^{12}C 越多，表明有机碳可能为生物合成。

** 科学家认为，地球上的生命是由非生命物质经过长期演化而来的，这种过程称为"化学进化"，以别于生物体出现后的"生物进化"。

量的交流。与热液一道喷出的有 H_2、He、Ar、CH_4、NH_3、H_2S、CO、CO_2 等气体和 Zn、Fe、Cu、Ba、Ca、Mg、Mn 等金属。某些金属与 H_2S 反应所形成的硫化物和硬石膏($CaSO_4$)等沉积于喷口周围,形成所谓"黑烟囱"(black smoker)(图 12－3)。烟囱冒出滚滚浓烟,喷出的热水高达摄氏数百度,与周围寒冷的海水发生了热交流,形成一个从摄氏数百度到零度的温度渐变梯度;喷出的物质浓度也从喷口向外逐渐降低,形成一个化学物质的渐变梯度。有人认为,这种特殊的水热环境提供了一个地球早期化学进化和生命起源的自然模型。他们认为,正是这两个渐变梯度为有关的化学反应提供了适宜的条件。它们像一个流动的化学反应器那样,在远古时代可能使 CH_4、H_2、NH_3 等还原性气体生成氨基酸、嘌呤、嘧啶等生物小分子,后者再聚合成蛋白质和核酸等生物大分子,并进而形成多分子体系的小滴,经过反复的"自然选择"(即能适合于当时环境条件的小滴被保存下来,不适合的就破灭了),终于形成了具有代谢作用和复制能力的原始生命体。由星际尘埃带到地球的有机分子,也可通过雨水来到海底水热喷口附近,参与化学进化过程,而喷口内外可能存在的特殊粘土[如蒙脱土(montmorillonite)]和各种有关的高热金属,则可能起着合成反应中的模板和无机催化剂的作用。人们认为,化学进化在海底水热系统中进行,不但时间可以大大缩短,而且还可以避免由于天体轰击地球所造成的巨大损害。这也是深海热泉所以受到研究生命起源学者们青睐的重要原因。

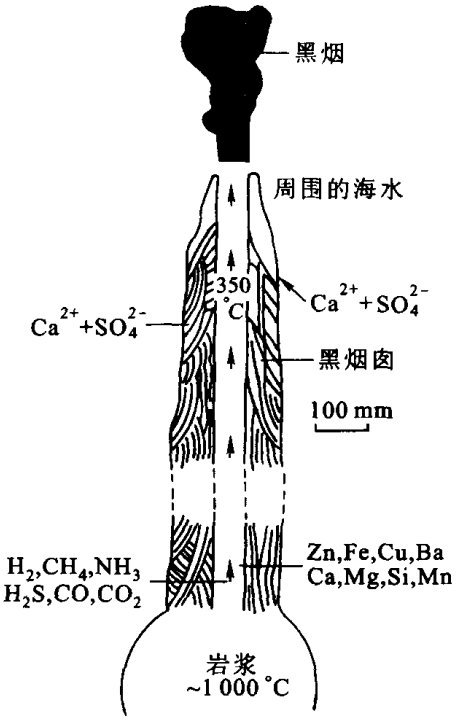


图 12－3 太平洋东部一处水热喷口——黑烟囱的示意图(据 J. B. Corliss 及 Haymon, 等的图(1981)改画)

12.1.3 原始生命体的可能类型

许多科学家认为,具有生物膜、实现了内外分隔的原始细胞才是真正的生命体,因而认为细胞的起源就是生命的起源;另一些科学家则认为,最复杂的多分子体系(原生体)和最简单的原始细胞之间仍有巨大的差别,因此在二者之间必然存在着种种过渡形态。对后一种意见,看来也不能完全排除。就目前所知,如果有非细胞的生命形态,也不外是以下的 3 类形式。

第 1 类是由蛋白质组成的前细胞生命体。奥巴林(А. И. Опарин, 1894～1980)提出的团聚体(coacervate)* 和福克斯(S. W. Fox, 1912～)提出的微球体(microsphere)**,基本上都属于这一类。科学家近年发现,引起羊搔痒病(scrapie)和疯牛病(bovine spongiform encephalopathy)以及人的克罗伊茨费尔特－雅各布病(Creutzfeldt-Jakob disease)、库鲁病(kuru disease)、格－施－沙病(Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease)和致命的家族性失眠

* 奥巴林等发现,蛋白质与糖类、蛋白质与蛋白质、蛋白质与核酸,它们的水溶液混在一起,在显微镜下都可能看到一些小滴,他把这种小滴称为团聚体。他认为有些团聚体能表现出某些生命现象,故可作为前生物模型来研究。

** 福克斯将 20 种天然氨基酸,按酸、碱、中性分别混合,在 170℃ 下加热数小时,可以得到具有天然蛋白质某些特性的氨基酸聚合物——类蛋白。将类蛋白放到稀薄的盐溶液中溶解,冷却后在显微镜下可看到无数的小球,福克斯称之为微球体。这是另一种研究前生物的模型。

症(fatal familial insomnia)的病原体,是一类名叫朊粒(prion)的蛋白质。这种蛋白质由 253～254 个氨基酸残基组成,查不出它们有核酸成分,它们进入宿主细胞后能在细胞中"增殖",释放出来的朊粒能继续感染其他细胞。据此有人推测,象朊粒这样的仅由蛋白质组成的生命体,似乎也可能在原始细胞之前出现。但后来的研究表明,所有哺乳动物的染色体上都有朊粒蛋白(P_rP)的基因,其表达产物 P_rP^c 是细胞的正常组分,并不致病。从濒死的患格－施－沙病的病人身上取出的 P_rP^c 基因,与取自健康人群的 P_rP^c 基因作比较,发现前者已发生了点突变,其表达产物 P_rP^{sc}能致病。进一步的研究发现,P_rP^c 的肽主链折叠成紧密的多重螺旋结构,而 P_rP^{sc}则变成伸展的 β 片层结构(图 12－4)。P_rP^{sc}是 P_rP^c 的一种异构体(isoform)。P_rP^{sc}本身不能繁殖,它是通过胁迫 P_rP^c 畸变而进行扩增的。一个 P_rP^{sc}分子击中一个 P_rP^c 分子,P_rP^c 分子在 P_rP^{sc}的胁迫下发生了结构变化,形成 P_rP^{sc}的二聚体;接着 2 个 P_rP^{sc}分子再分别击中 2 个 P_rP^c 分子,产生出 P_rP^{sc}四聚体,如此不断扩增,造成了复制的假象。由此可见,朊粒的情况仍然符合遗传信息由核酸流向蛋白质的"中心法则",朊粒并非仅由蛋白质组成的独立的生命体。

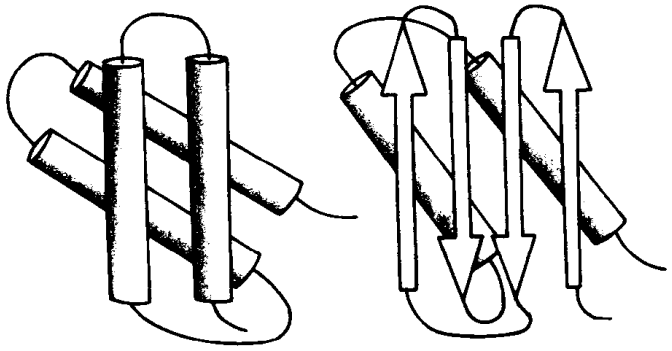


图 12－4 P_rP^c 与 P_rP^{sc}的构型
朊粒蛋白(P_rP^c)是无害的,它的主链缠绕成多重螺旋(左图中的圆柱体);当 P_rP^c 的主链伸展开来、变成 β 片层结构(P_rP^{sc})时(见右图的箭头棒),它就成了"搔痒病"等多种传染性疾病的病原体(仿 S. B. Prusiner, 1991)

第 2 类是由 RNA 组成的前细胞生命体。20 世纪 70 年代发现的类病毒(viroid),是一类仅由 RNA 分子构成的、能使若干种植物得病的病原体。例如,第一个被鉴定的类病毒——马铃薯纺锤形块茎病类病毒(potato spindle tuber viroid, PSTV)——就只含有一个由 359 个核苷酸组成的单链环状 RNA 分子,相对分子质量约为 1.0×10^5。RNA 分子中约有 70% 的碱基通过氢键配对而形成局部螺旋区,不配对的碱基则成为内环。螺旋区与内环交替排列构成类病毒的二级结构。由于现在的类病毒必须在特定的宿主植物的活细胞内寄生,才能表现出生命现象和进行复制,因而多数生物学家认为,它们不可能在细胞之前出现,它们不过是被某些细胞所遗弃的基因组,只有回到原来的细胞环境内才能进行复制和表达。因此,像现在类病毒那样仅由 RNA 组成的实体,不可能是原始的非细胞生命体。可是,到了 20 世纪 80 年代,美国的 S. Altman 和 T. R. Cech 先后发现了一类能起一些酶作用的 RNA,特称之为催化性核酸或核酶(ribozyme)。现在人们已从不同的生物中获得了数十种核酶。它们或催化自剪接内含子,或催化氨基酸间肽键的形成,或催化 tRNA 与氨基酸之间键的形成和断裂等。这类 RNA 既能携带遗传信息,又能提供酶的活性。据此,美国的 W. Gilbert 推论,在生命起源的化学进化过程中,可能有过一个特殊阶段。在这个阶段中,所有生命前体与生存和复制有关的全部化学反应均由 RNA 来催化,他称这个阶段为"RNA 世界"(RNA world)。"RNA 世界"在化学进化过程中起着承先启后的作用。有人推测,RNA

的发生及其在生命起源中所起的承先启后作用之发展过程，大致如图 12－5 所示。

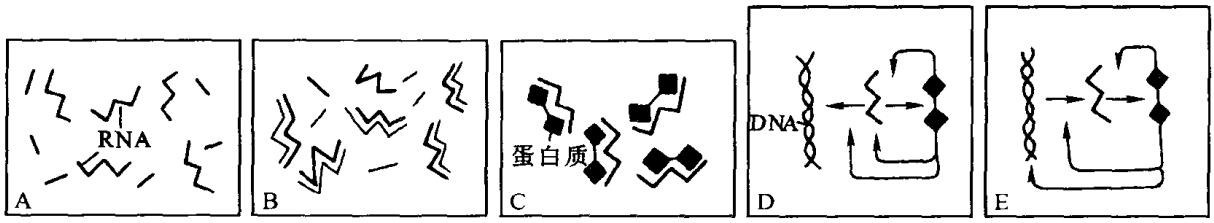


图 12－5 从 RNA 产生到完整遗传系统形成的可能途径

A. 表示在早期地球某些适宜环境里，RNA 能从其他有机分子中产生出来；B. 随着 RNA 分子的进化，它们通过自催化实现了自我复制；C. RNA 开始合成能起催化作用的蛋白质；D. 蛋白质帮助 RNA 自我复制和更有效地合成蛋白质，它们还帮助 RNA 制造能进化成 DNA 的双螺旋；E. DNA 增殖起来，并通过 RNA 制造蛋白质，蛋白质又帮助 DNA 进行复制，并把遗传信息转给了 RNA(引自 John Horgan, 1991)

尽管要证实“RNA 世界”的观点还有许多困难，诸如人工合成 RNA 不易，制造能自我复制的 RNA 就更困难；但这方面的研究进展也是诱人的。吡喃糖 RNA(pyranosyl RNA)和肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)(图 12－6)的合成，暗示现存的 RNA 可能由这些较易复制的前体分子进化而来。近年科学家能使核酶在试管内进行“定向的分子进化”(directed molecular evolution)，如使一些核酶的突变体与 DNA 接触，产生了一些有微弱裂解 DNA 能力的 RNA 分子，把这种 RNA 分子有选择地增殖，并在增殖过程中再引入新的突变体，以产生核酶的第 2 代。此第 2 代比起始群体具有更强的分解 DNA 的能力。将这一过程的完整循环进行 10 次，就会产生更强的在常温下就能分解 DNA 的新的 RNA 分子群体。这种实验由于符合达尔文的变异－选择原理，所以特别有意义。随着研究的深入，“RNA 世界”的设想，正得到越来多学者的认可，从而认为在地球进化早期，出现过像类病毒那样的仅由 RNA 组成的生命体，也不是不可能的。

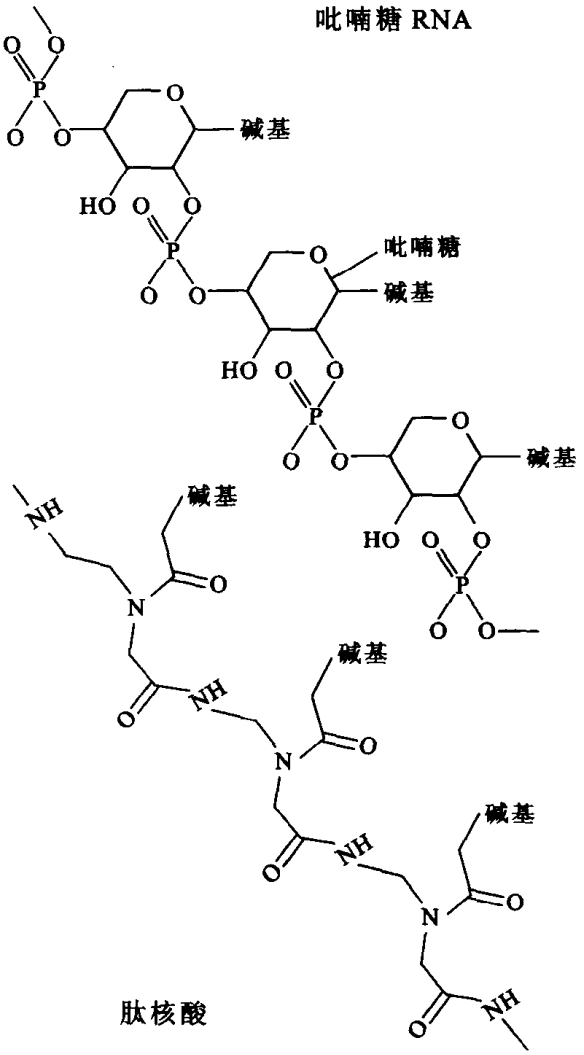
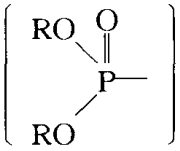
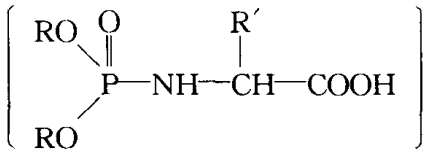


图 12－6 吡喃糖 RNA 和肽核酸的化学结构

吡喃糖 RNA 与 RNA 的区别在于其核糖是六碳糖而不是五碳糖；肽核酸则是以肽为骨架的一种 DNA 模拟物

第 3 类是由核酸和蛋白质共同组成的前细胞生命体。现在的病毒，就是没有细胞结构，但有遗传、复制等生命特征，主要由核酸(DNA 或 RNA)和蛋白质组成的微生物；而细

胞中无界膜、能合成蛋白质的颗粒结构——核蛋白体(ribosome)—亦由核糖核酸和蛋白质组成。鉴于蛋白质和核酸在化学进化过程中有可能同时形成,于是有的科学家认为,蛋白质和核酸的出现,大概无先后之分,并提出了"核酸和蛋白共同起源"的新学说。我国清华大学化学家赵玉芬于 20 世纪 90 年代发现,由双烷基磷酰基  与氨基酸组成的磷酰化氨基酸  ,是一种能同时合成多肽和多核苷酸的物质。只要周围存在着氨基酸和核苷,在常温下就能同时自动生成寡肽及寡核苷酸(图 12-7)。磷酰化氨基酸一方面与氨基酸逐次反应形成寡肽;另一方面与核苷逐次反应形成寡核苷酸。一侧的反应物和另一侧的反应物能被反复利用,从而使寡肽和寡核苷酸的合成能同时自动地进行。磷酰化氨基酸这种分子把蛋白质和核酸,物质、能量和信息偶联起来,成为一个符合生命基本特征的"超循环"进化体系,有力地支持了"核酸和蛋白质"的共同起源学说。如果事实果真如此,则由核酸和蛋白质组成的前细胞生命体也就有可能存在了。

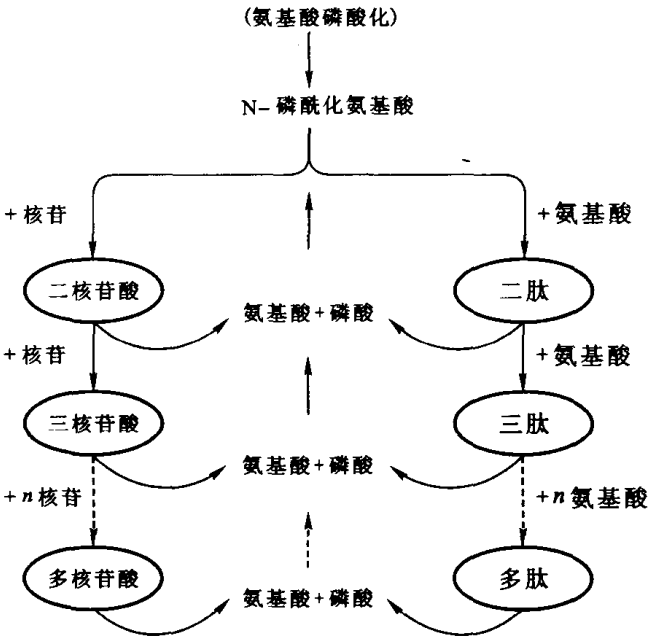


图 12-7　*N*-磷酰化氨基酸能同时合成寡肽和寡核苷酸的示意图

看来前细胞的生命形态,可能不只一种类型,也可能不是一次形成的,但究竟哪种类型最终发展为原始细胞,目前还难下结论,还需要有更多确切的实验结果来加以证明。

12.1.4　原始细胞的形成

从原始生命体到原始细胞,有两个关键问题要解决:一是细胞膜的产生,二是形成完整的遗传系统(含有 DNA、mRNA、tRNA 和核蛋白体)并逐步发展出较完善的密码体系。

12.1.4.1　细胞膜的产生

细胞膜的产生是原始细胞诞生的一个重要标志。细胞膜不但使细胞与周围环境隔开,令其液态的内含物保持一定的浓度和稳定性,使细胞内的各种化学反应得以顺利进行;而且对于许多生命现象,如膜内外物质的交换、信息的传递和能量的转换等,都有重要的作用。细胞膜的基本结构是在双层磷脂分子层上镶嵌着动态的功能蛋白质。磷脂分子是一类典型的双型性分子,其显著特点是,由于动力学的原因,在水中能自动排列成稳定的脂双层结构。这种自排能力对于生物膜的形成有重要意义。20 世纪 60 年代有人用高能电子照射烃类和

CO_2 的混合物，发现 CO_2 能直接添加到烃类中而形成脂肪酸。20 世纪 80 年代有人将 1969 年坠落在澳大利亚默奇森(Murchison)镇的碳质球粒陨石碎片的抽提物(有机化合物)与水相混时，发现它们会自动地组装成类似于细胞膜那样的结构(图 12－8)。其化学成分还不清楚，但可以肯定比现在的膜磷脂简单。由此使人想到，原始细胞细胞膜的形成，也可能与由陨石带来的有机物“原料”有关。

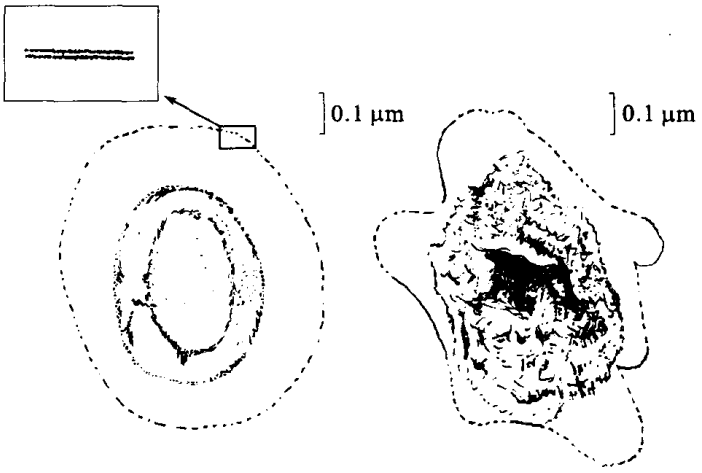


图 12－8 由 1969 年坠落在澳大利亚默奇森镇的碳质球粒陨石碎片抽提物与水作用后形成的脂质膜电镜照片
膜内是些无定形物质，左上角隐约示出膜的双层结构(根据 David Deamer, 1992 的照片描绘)

12.1.4.2 遗传密码的起源和发展

可以想象，在原始生命体时期，核酸的碱基顺序与蛋白质的氨基酸顺序两者之间的对应关系就可能已经建立了，只是形式比较简单，也不够稳定和严密。随着原始生命体和原始细胞的进化，遗传密码也不断丰富发展，以至最后固定下来，构成像现在那样的“遗传密码表”。美国学者戴霍夫(M.O.Dayhoff)研究了大量 tRNA 的核苷酸顺序资料，发现原始 tRNA 分子中，G、C 的含量远远超过 A、U 的含量，随着生物的进化，A、U 的含量才逐渐增加。据此，她认为原始的三联体密码的公式应是 GNC。第一位的 G 和第三位的 C 决定了翻译的方向；第二位的 N，可以是 G、C、A、U 4 种核苷酸中的任何一种，能够形成 GGC、GCC、GAC、GUC 4 种密码子，分别决定甘氨酸、丙氨酸、天冬氨酸和缬氨酸。这 4 种氨基酸是蛋白质分子中最常见、含量最多的氨基酸。看来地球早期化学进化过程中，最初的氨基酸可能就是这几种，最早的蛋白质大概也是由这几种氨基酸组成的。随着化学进化过程中氨基酸种类的增加，三联体密码子的种类也跟着扩展。第一次扩展是由 GNC 扩展为 GNY，Y 可以是 C 或 U，这样就可以形成 8 种密码子，虽然还是决定 4 种氨基酸(GGC、GGU 决定甘氨酸，GCC、GCU 决定丙氨酸，GAC、GAU 决定天门冬氨酸，GUC、GUU 决定缬氨酸)，但扩大了三联体突变的可能性，所以对原始生命体的进一步发展是有利的。第二次扩展是由 GNY 扩展为 RNY，R 可以是 G 或 A，这样就可以形成 16 种密码子，编码甘、丙、天冬、缬、丝、苏、天冬酰胺、异亮等 8 种氨基酸。这次扩展增加了原始生命体中蛋白质的多样性，但并未打乱原先 GNY 的框架，原有的对应关系可以保存下来。三联体密码的第三次扩展是由 RNY 扩展为 RNN，这里 R 是 G 或 A；N 是 G、C、A 或 U。这次扩展可以形成 32 种密码子，编码甘、丙、天冬、缬、丝、苏、天冬酰胺、异亮、谷、精、赖、甲硫等 12 种氨基酸，而且出现了起始密码 AUG，作为蛋白质合成中多肽链的开端。三联体密码的最后一次扩展是由 RNN 扩展为 NNN，N 可以是 G、C、A 或 U。这次扩展可以形成 64 种密码子，编码甘、丙、天冬、缬、丝、苏、天冬酰胺、异亮、谷、精、赖、甲硫、苯丙、亮、酪、半胱、色、组、脯、谷氨酰胺等 20 种氨基酸，大大增加了生命系统中蛋白质结构和功能的多样性；同时这次扩展还出现了 3 个无义密码子，充当肽链合成中的“终止信号”，这对于 tRNA 的进一步多样化也有意义。上述假说如果属实，就足以表明遗传密码也是随着

生命的进化而变化发展的。这对于理解细胞的起源和发展,也提供出一条重要的线索。

一旦产生了细胞膜和出现了比较稳定的遗传系统和密码体系,原始生命体也就变为原始细胞了。

12.2 从原核细胞到真核细胞

最初产生的细胞是原核细胞(prokaryocyte)。原核细胞与真核细胞(eukaryocyte)既有差别又有同源性。原核细胞体积小(一般直径 1 μm 左右),没有核膜因而无成形的细胞核,没有内质网、线粒体、高尔基体、质体(植物)等细胞器,无有丝分裂和减数分裂。真核细胞体积较大(一般直径 10~30 μm),有由双层核膜包围的细胞核,核内含染色质、核仁和核液,有内质网、线粒体、高尔基体、质体(植物)等细胞器,行有丝分裂或减数分裂时核膜破裂,核仁消失,染色质凝缩成多个染色体并出现纺锤体、中心体(动物和低等植物)等分裂器。原核细胞和真核细胞的同源性表现在:它们都有结构相似的细胞膜;信息表达都遵循"中心法则",都用同一套遗传密码;核蛋白体虽然一个是 70S 型、另一个是 80S 型,但两者的基本结构是一致的,都由两个大小不等的亚基构成,其化学成分都是 rRNA 和蛋白质;等等。从化石的资料看,是先有原核生物(prokaryote)后有真核生物(eukaryote),所以真核生物无疑是由原核生物进化而来的。原核生物大概在 30 多亿年前就出现了。原核生物经历了 20 多亿年的漫长岁月,直到 10 多亿年前才演化出真核生物。这个细胞演化的过程,由于缺乏化石资料,现在还知之甚少,不过近年已发现了许多新事实,也提出了一些新观点。

12.2.1 原始细胞的演化

20 世纪 70 年代,美国的 C.R.Woese 等人,在比较各种原核生物核蛋白体的 16S rRNA 碱基序列时发现,产甲烷菌(methanogens)的序列与其他原核生物的序列差异非常之大。他们认为现存的原核生物在远古时代就已分成两大类:一类他们称之为真细菌(Eubacteria),包括各种细菌、蓝细菌、放线菌、螺旋体、立克次氏体、支原体和衣原体;另一类他们称之为古细菌(*Archaebacteria*)。最初知道的古细菌只是几种产甲烷菌,后来发现生活在大盐湖和死海等处高浓度盐水中的盐杆菌(*Halobacteria*)、生活在 80℃ 以上硫磺泉中的硫化叶菌(*Sulfolobus*),以及生活在发烟的燃烧煤尾中的热原质体(*Thermoplasma*)等也都是古细菌。古细菌具有一些原核生物的特征,但另一些特征却与真核生物的相似,还有一些它们独有的特征(表 12-1)。它们既非真核生物,也不同于一般的原核生物。因此,有人称古细菌为"第三生命形态"。据此,Woese 于 1990 年提出,将整个生物世界分为 3 个"域"(domain):(1)细菌域(Bacteria),包括属于原来真细菌的各种原核生物;(2)古菌域(Archaea),包括产甲烷菌、极嗜盐菌(halophiles)和嗜酸热菌(thermoacidophiles)等;(3)真核域(Eukarya),包括真菌界、植物界和动物界的各类真核生物。近年支持三域分类的学者正日益增多。

细菌域、古菌域和真核域三者的进化关系目前还不十分清楚,但从表 12-1 举出的事实看,古细菌与真核生物的关系似乎更近些。科学家发现,就 RNA 聚合酶的结构、核蛋白体的蛋白质组分,以及转录和翻译的机理来说,古细菌与真核生物比与真细菌更相似,表明古细菌与真核生物大概是同源的,真核生物的原核祖先可能来自古代古细菌中的一支。至于真核生物起源于哪一类古细菌,目前还没有确定的看法。不过近年已将古细菌划分为泉发

古细菌(Crenarchaeota)和广生古细菌(Euryarchaeota)两个界(Kingdom),前者与细菌域接近,后者与真核域接近(图 12－9)。在图 12－9 中,真核域的微孢子虫类(Microsporidia)和双滴虫类(Diplomonad),以及内变形虫(*Entamoeba*)等,还残留着许多原核生物的特点。它

表 12－1 古细菌、真细菌和真核生物主要特征的比较

	古细菌	真细菌	真核生物
核膜	无	无	有
膜围细胞器	无	无	有
核蛋白体	70S(30S、50S)	70S(30S、50S)	80S(40S、60S)
鞭毛	无"9＋2"结构	无"9＋2"结构	有"9＋2"结构
DNA	环状,不与蛋白质结合	环状,不与蛋白质结合	与染色体蛋白质相结合
细胞分裂	简单的二分裂	简单的二分裂	有丝分裂、减数分裂
起始 tRNA	甲硫氨酰 tRNA	甲酰甲硫氨酰 tRNA	甲硫酰 tRNA
5SrRNA 的二级结构	有 5 个螺旋区	有 4 个螺旋区	有 5 个螺旋区
细胞壁	无胞壁酸(muramic acid)	有胞壁酸	植物细胞壁的主要成分是纤维素和果胶
细胞膜脂	醚键连接	酯键连接	酯键连接
光合色素	盐杆菌含细菌视紫红质(bacteriorhodopsin)	光合细菌含细菌叶绿素(bacteriochlorophyll)	高等植物含叶绿素 a、b
能量代谢	产甲烷菌、硫化叶菌等通过用 H_2 还原 CO_2 或 S 生成 CH_4 或 H_2S 来获得能量,属化能无机营养(chemolithotrophy)	通过厌氧呼吸或需氧呼吸获得能量	通过氧化磷酸化产能

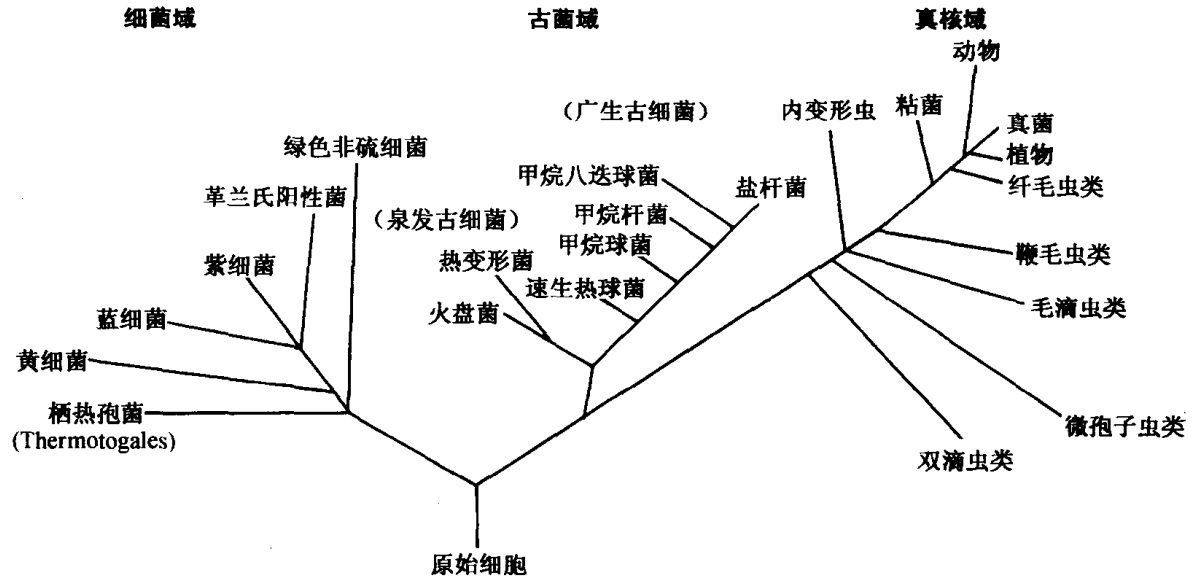


图 12－9 生物三域分类的系统树(仿 C. R. Woese, 等, 1990, 略有修改)

们虽然有成形的细胞核(这是真核生物的特点)但无线粒体及典型的高尔基体,核蛋白体还是 70S 的。这些都是原核生物的特点。因此,这些生物被称为源真核生物(Archezoa),是比

较原始的真核生物。其中双滴虫类[以蓝氏贾第虫(*Giardia lamblia*)为代表]最原始,它们不但无线粒体及高尔基器,而且无核仁,核模不完整、有缺口,是现存最原始的源真核生物。有的学者怀疑这是它们营寄生生活、结构退化的结果。但从特征的中介性看,说它们是一些从远古的古细菌向真核生物过渡的原始类型,还是比较合理的。1996 年 8 月,美国基因组研究所(The Institute for Genomic Research)发表了一种甲烷球菌(*Methanococous jannashii*)的全基因序列,表明这种古细菌的全基因组包括一个 1 664 976 bp 的环状染色体和一大(58 407 bp)、一小(16 550 bp)两个染色体外成分(extra-chromosome elements),其所含的 1 738 个基因中,竟有 58% 的基因是全新的! 而且古细菌的有关能量、代谢和细胞分裂的多数基因与真细菌相似,而有关复制、转录和翻译的多数基因却与真核生物更相似,这就进一步支持了生物的三域分类学说和古细菌与真核生物有过一段共同进化途径的论断。

Woese 认为,真细菌、古细菌和真核生物的共同祖先,系由单一的原始细胞演化而来(图 12 - 9)。一般的看法是,真核生物只有两次从真细菌获取基因:从好氧细菌获得线粒体基因,从蓝细菌获得叶绿体基因。因而只有在线粒体和叶绿体的 DNA 中(或由它们转移到细胞核的 DNA 中)才含有真细菌的基因。而且旧的看法认为,细菌基因只转移给真核生物而不转移给任何古细菌。可是近年的研究表明,不但真核生物存在着大量除线粒体和叶绿体外的真细菌基因,而且古细菌也拥有大量的真细菌基因。例如,典型的古细菌——闪砾古球菌(*Archaeoglobus fulgidis*)就用真细菌型的还原酶——3 - 羟 3 - 甲基戊二酰辅酶 A(3 - hydroxy 3 - methyglutaryl coenzyme A, HMGCoA)来合成膜脂。此外,许多真核生物还含有一些不同于任何已知古细菌或真细菌的、来路不明的基因(有人推测这些基因可能来自早已绝灭的三域以外的第四类生物)。对于上述的种种意外现象,有人主张用横向基因转移(lateral gene transfer, LGT)来解释。他们认为,现存的 3 个域生物不是来自单一的原始细胞,而是来自远古时代的一群原始细胞。它们的基因各不相同,但频繁地进行着横向的基因交流,所以由它们发展出来的细菌域、古菌域和真核域生物,就呈现出"你中有我"、"我中有你"的奇特现象(参阅图 12 - 11)。以后种间横向基因转移的过程就逐渐减弱,今天这种现象在自然界已极其罕见。

12.2.2 真核细胞的起源

真核细胞的起源主要涉及两个问题:一是真核细胞何时出现? 二是原核生物怎样演变成真核生物? 第一个问题由于缺乏直接的化石证据,只能作间接的推测。真核生物绝大多数是好氧的,只有当大气中氧达到一定的含量时它们才能生存。地质资料显示,大约在 20 亿年前陆上出现了"红层"(red beds),岩层中的 Fe_2O_3 变成了 Fe_3O_4,这表明那时大气中的游离氧已显著增加;又根据最早的后生动物(metazoa)化石约出现于 7 亿年前,而分子生物学的研究指出,后生动物(即多细胞动物)的演化史还可追溯到 9～10 亿年前。这样看来,单细胞的真核生物当起源于 20 亿年前至 10 亿年前之间。鉴于现代真核细胞的直径(10～30 μm)显著大于原核细胞的直径(通常在 1 μm 左右)。因此,大范围地测量统计前寒武纪化石细胞的直径,有可能找到由原核生物过渡到真核生物的时间。美国微体化石专家 J. W. Schopf,曾做过一次规模较大的测量统计,发现大约在 14～15 亿年前的化石细胞,直径有一明显的增大。虽然测量统计的化石标本还不够多,但也可以约略看出,真核生物的起源时间大致就在 15 亿年前左右。

至于由原核生物怎样演变为真核生物的问题，近年比利时的细胞生物学家、诺贝尔奖获得者 Christian de Duve 在前人观点的基础上提出了一种综合性的看法，比较有说服力，其要点如下(图 12－10)：

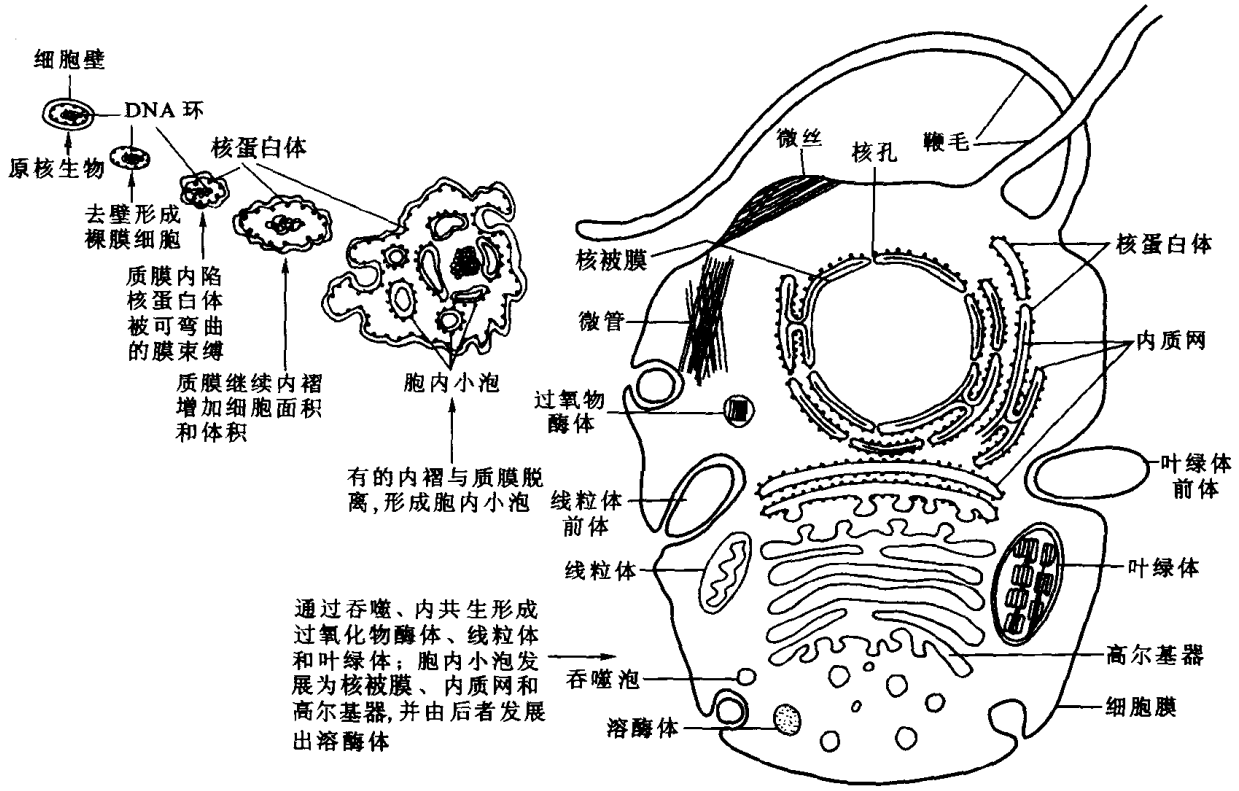


图 12－10 从原核细胞进化到真核细胞的示意图
(仿 Christian de Duve, 1996)

1．大约在 20 亿年前，大气中的 O_2 含量显著增加，某些原核生物在酶的作用下除去了细胞壁，成为质膜裸露的细胞，其核蛋白体则被一些可弯曲的膜所束缚。

2．质膜不断内陷，扩大了细胞的面积和体积。

3．有的质膜进一步内陷，终于与细胞膜脱离，进入细胞质内，形成众多的“胞内小泡”(intracellular vesicle)，胞内小泡的外膜附有核蛋白体。

4．有些胞内小泡围绕着拟核(nucleoid)(即 DNA 环)排列，后来就发展为带孔的双层核膜，于是拟核就变成了细胞核(拟核的 DNA 如何变成染色体他没有说明)。此外，还出现了微管和微丝，形成了细胞骨架，支撑着整个细胞，并使细胞能作伸缩运动。

5．以后通过吞噬(phagocytosis)(吞入好氧细菌或蓝细菌)和内共生作用(endosymbiosis)，相继形成了过氧物酶体(peroxisome)、线粒体和叶绿体等细胞器。由于有了这些细胞器，不但消除了氧的毒害作用(如过氧物酶体能将 O_2 转化为 H_2O_2，后者能被过氧化氢酶所分解)，而且还能利用氧来产能(如线粒体利用氧化产生的能量来组装“能量货币”ATP)；与此同时，胞内小泡也进一步发展为内质网和高尔基器，并由后者与吞噬泡(phagocytic vesicle)一道，共同产生出溶酶体(lysosome)。于是原来厌氧的原核生物就转变为好氧的、有膜围细胞器的真核生物了。

6. 生存于 20 亿年前的、有吞噬能力的原核生物，由于它们演变出能使氧从有害变为有利的细胞器而成为后来所有真核生物的祖先。

以上就是 de Duve 关于真核细胞起源的基本看法，其特点是认为真核生物的祖先是一类有吞噬能力的原核生物，它们通过吞噬（好氧细菌和蓝细菌）及以后的内共生作用而形成了线粒体和叶绿体，他认为过氧物酶体也是吞噬和内共生的产物。至于核被膜、内质网和高尔基器却是质膜经过内陷、分化形成的，而溶酶体的产生则与高尔基器和吞噬泡有关。近年有人根据已有知识推测，上述共生体的宿主细胞可能是像热原质体（*Thermoplasma*）那样的古细菌；形成线粒体的可能是像蛭弧菌（*Bdellovibrio*）和副球菌（*Paracoccus*）那样的真细菌；而构成叶绿体的则可能是古代的蓝藻，特别是蓝藻中与聚球藻属（*Synechococcus*）相近的种类，因为它们的 5S rRNA 与叶绿体的 5S rRNA 差异最小。

综上所述，从始祖细胞群进化到现今地球上各大类生物的过程，大致如图 12－11 所示。

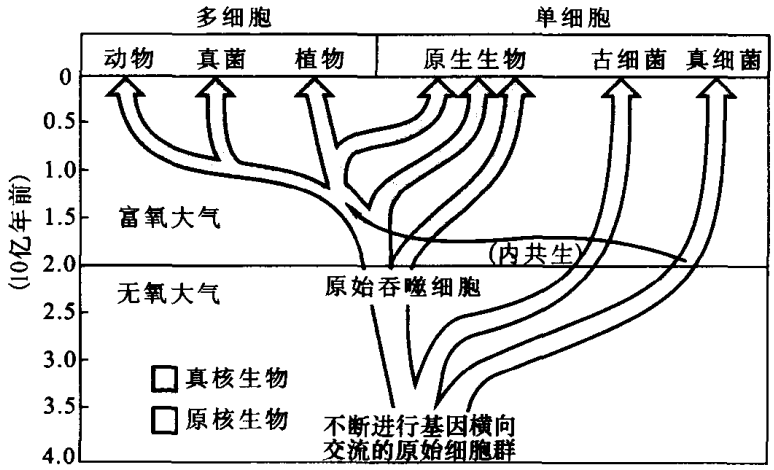


图 12－11　从原始细胞群进化到现今各大类生物的系统树示意图
（根据 Christian de Duve, 1996 和 W. Ford Doolittle, 2000 的图改绘）

12.3　从单细胞生物到多细胞生物

12.3.1　生物从单细胞到多细胞的可能途径

比较一下各类生物的结构形式，可以约略看出生物从单细胞到多细胞的可能途径。这种途径大致分为两步：第一步是各个单细胞生物连结起来，形成群体（colony）；第二步是细胞发生了分化（differentiation），并在它们之间出现了协调（coordination）。第一步比较简单，通过细胞分裂后彼此不分开就能达到；第二步却非常复杂，主要与基因的程序性表达和神经、激素的作用有关。不少原核生物已有多细胞化的趋势。例如，蓝细菌鱼腥藻（*Anabaena*）在淡水池塘里就形成细丝状的单细胞群体，每个细胞都能进行光合作用，独立生活。但当环境的含氮量降低时，群体中就分化出异形胞（heterocyst）（图 12－12）。

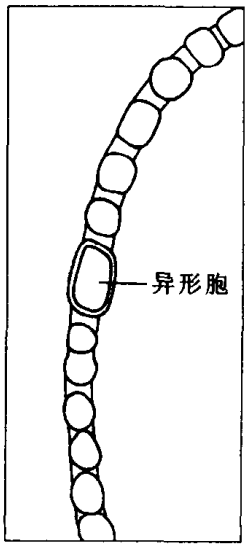


图 12－12　鱼腥藻

异形胞能固氮，但不能进行光合作用，有亚显微通道连接着光合细胞和异形胞。被固定的氮可以运向光合细胞，光合作用的产物也可以运到异形胞。又如许多粘球菌（*Myxococcus*）都能形成多细胞的子实体（fruiting body）（图 12－13）。这种子实体由一主柄和许多特殊的单细胞孢子构成，前者断裂后孢子就散落而形成许多新的菌落。不少原核生物虽然已有明显的多细胞化趋势，但由于其原核细胞的遗传系统还不能实现复杂的细胞间的调控，所以都不能进化到组织、器官的结构，而只能停留在单细胞群体的水平上。只有真核生物才能发展出各种高度分化、执行特殊功能的组织、器官和系统，直至形成为高等的多细胞动、植物。

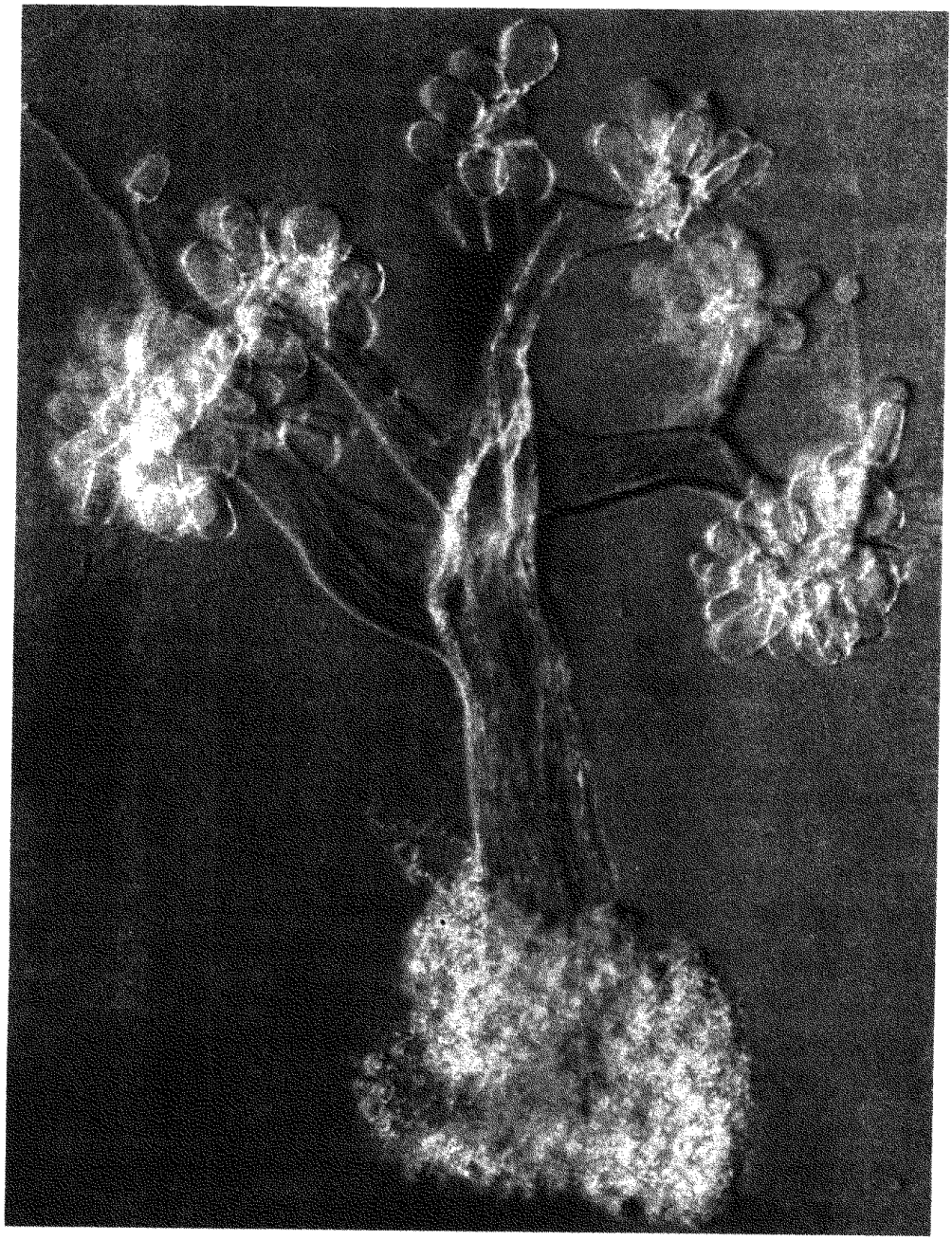


图 12－13　一种粘球菌——藏红花软骨霉状菌（*Chondromyces crocatus*）的多细胞子实体照片（放大 268 倍）（自 James A. Shapiro, 1988）

植物从单细胞到多细胞的可能途径,通过观察单细胞的衣藻(*Chlamydomonas*)、未分化的群体盘藻(*Gonium*)、实球藻(*Pandorina*)和空球藻(*Eudorina*),到已分化的群体团藻(*Volvox*)之发展过程,也看得比较清楚。最早出现的后生植物(metaphyte)(即多细胞植物)可能是具有片状结构的原植体植物(thallophytes)。

在动物,最初的细胞分化和协调,可以水螅(*Hydra*)为例来说明。最先发展出来的多细胞结构可能是上皮细胞的薄片(epithelial cell sheet)。它们首先把机体与外部环境隔开;然后分化出各种细胞,分别执行不同的功能;最后分化出神经细胞,进行整体协调,使水螅成为一个能适应环境的多细胞有机体。水螅的身体由两层细胞(即内胚层和外胚层)及由它们围成的消化腔组成,两层细胞之间有中胶层。内、外胚层最初就是两层上皮细胞的薄片,后来内胚层分化出内皮肌细胞、腺细胞、感觉细胞和间细胞,主要执行消化功能,内皮肌细胞的基部具有环行的肌纤维,收缩时可使身体变细变长;外胚层分化出外皮肌细胞、刺细胞、感觉细胞、间细胞和神经细胞,主要功能是保护、运动和感觉,其中外皮肌细胞的基部有纵行的肌纤维,收缩时可使身体和触手变短。神经细胞有许多突起,并且彼此连结成网。这种网状神经可对整个身体进行调控,使水螅的各部分得以和谐协调。

12.3.2 细胞分化的类型和机理

种子植物的组织可分为分生组织和永久组织两大类。分生组织(meristematic tissue)能不断分裂生长,并陆续分化成永久组织。分生组织还可再分为顶端分生组织(apical meristem)、侧生分生组织(lateral meristem)和居间分生组织(intercalary meristem)。根尖、茎端的生长点及茎内的形成层均属分生组织,能使植物不断长高和加粗。永久组织(permanent tissue)具有特殊的结构和执行特殊的功能,细胞已停止分裂。永久组织包括保护组织(protective tissue)(如表皮、木栓等)、薄壁组织(parenchyma)(如叶肉、根毛等)、机械组织(mechanical tissue)(如各种纤维)、输导组织(conductive tissue)(如由木质部和韧皮部组成的维管束)和分泌组织(secretory tissue)(如密腺、油囊、树脂道等)。

高等动物特化出 200 多种不同类型的细胞,分别组成 4 大组织,执行特定的生理功能:①上皮组织(epithelial tissue),来自外胚层,由上皮细胞紧密排列而成,覆盖于机体内外及囊腔和管道的表面,有保护、吸收、排泄和分泌等功能;②结缔组织(connective tissue),来自中胚层,有由分散的成纤维细胞、肥大细胞、浆细胞、巨噬细胞、胶原纤维和弹性纤维等组成的疏松结缔组织(loose connective tissue)和由细胞和纤维组成的韧带(ligament)和腱(tendon)[属致密结缔组织(dense connective tissue)]。此外,由骨细胞、基质和纤维构成的软骨(cartilage)和骨(bone),以及运输气体和养料的血液(blood)(包括血浆、红细胞、白细胞和血小板),也是结缔组织;③肌肉组织(muscular tissue),来自中胚层,由肌细胞组成,又分心肌(cardiac muscle)、平滑肌(smooth muscle)和横纹肌(striated muscle)3 种,能够收缩和舒张;④神经组织(nerve tissue),来自外胚层,由神经细胞和神经胶质细胞(neuroglia cell)组成,能感受刺激和传导兴奋。

如上所述,高等动物身体内有 200 多种不同类型的细胞,它们分别形成不同的组织和器官,执行不同的生理功能,但每种动物的细胞都各自含有基本相同的基因。试问一个受精卵怎么发展出这么多种类型的细胞呢?不难理解,细胞的分化是一个从化学分化到形态分化和功能分化的过程。从分子水平看,细胞的分化首先是各种细胞内合成不同的蛋白质。例

如,红细胞合成血红蛋白、肌细胞合成肌球蛋白和肌动蛋白等等,而不同蛋白质的合成又是通过细胞内一定的基因表达来实现的。按一定时序哪些基因表达、哪些基因不表达,都要受调节机理的控制。因此,基因调控问题就成了细胞分化和胚胎发育的中心问题。20 世纪 80 年代,科学家在果蝇中发现有一些基因控制着胚胎的空间结构,进而发现这些基因都有一段相同的、由 180 个核苷酸组成的序列,称为同源框(homeobox)。同源框编码由 60 个氨基酸残基组成的肽段,这个肽段连结到特定基因的 DNA 双螺旋上,就能使这些基因打开或关闭。目前已经在从蠕虫到人的各类动物中(甚至一些植物中)都发现有这种同源框基因(*Hox* gene)。接着又发现了在进化上也是高度保守的趋异同源框基因(divergent homeobox gene)(简称 Dox 基因),其主要功能是参与细胞的分化。因此,同源框基因和趋异同源框基因可能是揭示胚胎发育和细胞分化机理的重要线索。当前同源框基因已成了分子遗传学和发育生物学的研究热点,相信在不久的将来就能揭开多细胞生物细胞分化和胚胎发育机理的奥秘。随着性别分化和单倍体 - 二倍体世代的交替出现,生物演化的速度也就大大加快了。

内 容 提 要

本章分三步——从分子到原始细胞、从原核细胞到真核细胞、从单细胞到多细胞——简要地介绍了有关细胞起源与演化的一些较新信息。根据近年发现的科学事实推测,生命可能在 40 亿年前就已发生,当时地球的条件是极其严酷的。最初的有机物可能由小行星和彗星通过撞击而带到地球,也可能在深海热泉的喷口周围合成。由这些有机物逐步演化出能自我更新和自我复制的原始生命体。前细胞的生命体可能仅由 RNA 组成,或由核酸和蛋白质共同组成。从原始生命体到原始细胞的关键,是形成了细胞膜和出现了较完整的遗传系统。最初的原始细胞可能是行化能无机营养的,以后才进化出行光能自养和化能异养的类型。原始细胞很早就分化为真细菌、古细菌和真核生物三大支,真核生物的原核祖先可能来自古细菌的某一支。原始细胞可能不是单一的始祖生物,而是很多彼此的基因并不相同但频繁地进行着横向基因交流的细胞群。20 亿年前大气中的氧含量显著增加,一类有吞噬能力的原核生物,通过吞噬(好氧细菌及蓝细菌)和内共生作用,相继形成了过氧化物酶体、线粒体和叶绿体等细胞器,使氧从有害变为有利。这类原核生物就成了后来所有真核生物的祖先。大量的真核生物约出现于 15 亿年前。多细胞动、植物的共同祖先是某种单细胞的真核生物。真核生物的多细胞化(multicellularity)大概在 10 亿年前就已开始,其可能途径是先形成单细胞群体,然后出现细胞间的分化和协调。生物各类细胞分化的机理主要与其基因表达的时空程序调控有关,这是一门新兴学科"进化 - 发育生物学"所要研究的重要问题之一。

思 考 题

1. 根据现有的科学事实,你认为生命可能在何时、何处和怎样起源的?
2. 有人说,细胞起源就是生命的起源,不存在前细胞的生命形态。你对此有何看法?
3. 沃伊斯的生物三域分类学说对阐明细胞的起源和演化有何意义?

4. 性别分化和单倍体－二倍体世代的交替出现，对多细胞生物的产生和发展有何促进作用？

参考资料

1. 康育义. 生命起源与进化. 南京：南京大学出版社，1997. 63～64，173～174
2. 张昀. 生物进化. 北京：北京大学出版社，1998. 62～64
3. 李靖炎. 真核细胞起源研究的进展. 见：细胞生物学进展. 第 1 卷. 北京：高等教育出版社，1988. 185～209
4. 李靖炎. 双滴虫与细胞核起源问题的探索．动物学研究，1996，3：275～286
5. 彭奕欣. 生命起源问题的新争论. 生物学通报，1997，5：7～9
6. 黄秀梨主编. 微生物学. 北京：高等教育出版社，1998. 82
7. Horgan J. 进化趋势：生命的起源. 科学，1991(6)：55～65
8. Bernstein M P, Sandford S A, Allamandola L J. 来自太空的生命原料. 科学，1999(10)：8～15
9. Holm N G. Why are hydrothermal systems proposed as plausible environments for the origin of life? In: Origins of Life and Evolution of the Biosphere, 1992, 22: 5～14
10. Woese C R, Kandler O, Wheelis M L. Towards a natural system for organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 4576～4579
11. de Duve C. 复杂细胞的诞生. 科学，1996(8)：8～15
12. Alberts B, Bray D, Lewis J, *et al*. Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. New York & London: Garland Publishing Inc, 1994. 3～25
13. Shapiro J A. 作为多细胞有机体的细菌．科学，1988(10)：31～39
14. Doolittle W F. 彻底挖掘生命之树. 科学，2000(5)：42～48

名词索引

A

癌基因(oncogene) 261,276,282
暗反应(dark reaction) 141
暗视野显微镜术(dark field microscopy) 13

B

"伴娘"蛋白(chaperone protein) 86,88
巴氏小体(Barr body) 194
包涵素(clathrin) 61
孢子减数分裂(sporic meiosis) 254
胞内受体超家族(intracellular receptor superfamily) 319
胞内体(endosome) 61,65
胞内小泡(intracellular vesicle) 361
胞液(cytosol) 77
胞饮作用(pinocytosis) 60
胞质环(cytoplasmic ring) 178
胞质环流(cyclosis) 162
胞质溶胶(cytosol) 77
保守分选机制(conservative sorting mechanism) 136
被动运输(passive transport) 48
吡喃糖 RNA(pyranosyl RNA) 355
臂比(arm ratio) 201
编码蛋白基因(protein－coding gene) 184
鞭毛(flagella) 167
变形虫样运动(ameboid motion) 162
表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF) 272
表皮增殖单位(epidermal proliferative unit) 300
冰冻断裂蚀刻电镜术(freeze fracture－etching electron microscopy) 32
冰冻断裂蚀刻复型(freeze fracture－etching replicas) 15
病毒癌基因(v－onc) 276
波形蛋白(vimentin) 172

C

残留小体(residual body) 104
糙面内质网(rough endoplasmic reticulum, rER) 80
长散在重复元件(long interspersed elements, LINEs) 185
常染色质(euchromatin) 194,229
超螺线管(super－solenoid) 195
超速离心机(ultracentrifuge, UCF) 18
沉默子(silencer) 221
成虫盘(imaginal disc) 287
成膜体(phragmoplast) 253
成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF) 245
成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF) 273
程序性细胞死亡(programmed cell death) 109,344
赤道板(equatorial plate) 248
重复序列(repetitive sequence) 184,185
重组 DNA(recombinant DNA) 22
重组结(recombination nodule) 258
初级溶酶体(primary lysosome) 103

触角足复合物(antennapedia complex ANT－C) 297
串联重复序列区段(block of tandemly repeated sequence) 187
次级反应(secondary response) 319
次级溶酶体(secondary lysosome) 103
次缢痕(secondary constriction) 202
粗线期(pachytene stage) 258

D

带型(banding pattern) 207
单倍体(haploid) 198
单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNPs) 187
单克隆抗体(monoclonal antibody) 20
单体 GTP 结合蛋白(monomeric GTP－binding protein) 67
单位结构(unit structure) 80
单位膜(unit membrane) 26
单位纤维(unit fiber) 195
单一序列(unique sequence) 184
胆固醇(cholesterol) 28
蛋白激酶 C(PKC) 218,273,327
蛋白水解酶复合物(proteasome) 266
蛋白转移器(protein translocator) 75
导肽(leader peptide, targetting peptide) 133
灯刷染色体(lampbrush chromosome) 210
低密度脂蛋白(low－density lipoprotein, LDL) 60
底板(floor plate) 292
电化学梯度(electrochemical gradient) 54
电压门通道(voltage－gated channel) 50
电子传递链(electron－transport chain) 122,124
定量细胞化学(quantitative cytochemistry) 14
定向的分子进化(directed molecular evolution) 355
动力蛋白(denein) 247
动力蛋白臂(dynein arms) 167
动力学不稳定模型(dynamic instability model) 155
动粒(kinetochore) 202,246,251
动粒结构域(kinetochore domain) 202
动粒微管(kinetochore microtubules) 246,248
端粒(telomere) 203
端粒 DNA 序列(telomere DNA sequercce, TEL) 206
端粒检测盒(telomere detection kit) 204
端粒结合序列(telomere associated sequence, TAS) 203
端粒酶(telomerase) 204
端粒重复因子(telomeric repeat factor, TRF) 204
短散在重复元件(short interspersed elements, SINEs) 185
"多能"细胞(pluripotent cell) 287
多倍体(polyploid) 198
多倍性(polyploidy) 198
多核蛋白体(polyribosome) 81
多级螺旋模型(multiple coiling model) 195
多细胞化(multicellularity) 362,365
多线染色体(polytene chromosome) 209

E

二倍体(diploid) 198
二分对称性(dyad symmetry) 192
二价体(bivalent) 256
二酰基甘油(diaxylglycerol DG) 326

F

翻译后转移(posttranslational translocation) 86
反式作用因子(*trans*－acting factor) 219,221,228
泛醌或辅酶 Q(ubiquinone, CoQ) 122
泛素－蛋白水解酶复合物水解系统(ubiquitin－proteasome proteolytic system, UPPS) 26,268
房室(compartment) 74
纺锤体(spindle) 246,247
纺锤体组装检验点(spindle assembly checkpoint) 240
放射自显影技术(autoradiography) 19
非保守分选机制(non conservative sorting mechanism) 136
非编码 RNA(ncRNA) 185
非编码 RNA 基因(noncoding RNA gene) 185
非活性染色质(inactive chromatin) 193
非循环式光合磷酸化(non－cyclic photophosphorylation) 145
非组蛋白(non－histone) 189
非组蛋白蛋白质(non－histone proteins, NHP) 189
分散高尔基器(dictyosome) 95
分选信号(sorting signal) 75
分子"伴娘"(molecular chaperone) 89,133,134

分子团(micell) 31
分子杂交法(molecular hybridization method) 24
辐(spoke) 178
负染法(negative staining) 15
复制单位(replication unit) 242
复制后复合物(post－replication complex) 244

G

钙调素(calmodulin, CaM) 241, 327
高尔基复合体(Golgi complex) 95
高尔基器(Golgi apparatus) 95
高尔基体(Golgi body) 95
高密度脂蛋白(high－density lipoprotein, HDL) 61
构象假说(conformational hypothesis) 127, 128
古菌域(Archaea) 358
古细菌(*Archaebacteria*) 358
骨架和辐射环模型(scaffolding model & radial loop model) 195
寡糖转移酶(oligosacharyl transferase) 89
关键序列(key sequence) 205
管家基因(house keeping gene) 302
光反应(light reaction) 141
光合反应中心(photosynthetic reaction center) 35
光合作用(photosynthesis) 141
光面内质网(smooth endoplasmic reticulum, sER) 82
光驱动泵(light－driven pump) 56
光学显微镜技术(light microscopy) 11
鬼笔环肽(phalloidine) 155
过氧物酶体(peroxisome) 111, 361

H

合胞体胚盘(syncytial blastoderm) 287
合子减数分裂(zygotic meiosis) 254
核被膜(nuclear envelop) 177, 182
核蛋白体(ribosome) 214, 216, 217, 356
核定位信号(nuclear localization signal, NLS) 181
核骨架(nuclear skeleton) 217
核基质(nuclear matrix) 217, 218
核孔(nuclear pore) 178
核孔蛋白(nucleoporin) 178
核孔复合物(nuclear pore complex, NPC) 178, 182, 217
核篮(nuclear basket) 178
核酶(ribozyme) 354
核内膜(inner nuclear membrane) 178
核内有丝分裂(endomitosis) 209
核仁(nucleolus) 212, 214, 217
核仁基质(nucleolar matrix) 213
核仁内染色质(intranucleolar chromatin) 213
核仁素(nucleolin) 213, 262
核仁相连染色质(nucleolar－associated chromatin) 213
核仁周边染色质(perinucleolar chromatin) 213
核仁组织区(nucleolar organizing region, NOR) 202, 214
核输出信号(nuclear export signals, NES) 182
核酸酶超敏感位点(nuclease－hyper－sensitive site) 193
核外膜(outer nuclear membrane) 178
核纤层(nuclear lamina) 182, 217, 247, 251, 262
核纤层蛋白(lamins) 172, 182, 251
核小体(nucleosome) 190, 230
核小体核心颗粒(nucleosome core particle) 190
核小体组蛋白(nucleosomal histone) 188
核心 DNA(core DNA) 190
核心成分(core element) 220, 223
核心组蛋白(core histone) 190
核型(karyotype) 207
核型模式图(idiogram) 207
核质蛋白(nucleoplasmin) 180
核质环(nuclear ring) 178
核转录因子(nuclear transcription factor) 278
后期(anaphase) 246, 249
后期促进复合物(anaphase－promoting complex, APC) 266
后生动物(metazoa) 360
后生植物(metaphyte) 364
呼吸链(respiratory chain) 122, 124
化学进化(chemical evolution) 352
化学渗透假说(chemiosmotic hypothesis) 127, 128
坏死(necrosis) 343
环状片层(annulate lamellae) 84
黄素蛋白(flavoprotein) 122
活性染色质(active chromatin) 193

J

肌动蛋白(actin) 152,218,252
肌动蛋白丝(actin filament) 152
肌钙蛋白(troponin) 156
肌球蛋白(myosin) 156,252
肌原纤维(myofibrils) 158
基粒(elementary particle) 122,139
基因(gene) 183
基因论(the theory of gene) 4
基因阻抑蛋白(gene repressor protein) 228
基因组(genome) 183
基质(matrix) 122,141
激光扫描共焦显微镜术(laser scanning confocal microscopy, LSCM) 14
极低密度脂蛋白(very - low - density lipoprotein, VLDL 或 LDL) 94
极粒(polar granules) 287
极微管(polar microtubules) 246
极细胞(pole cells) 287
极质(polar plasm) 287
嵴(cristae) 122
假基因(pseudogene) 186
间体或质膜体(mesosome) 26
间隙连接(gap junction) 312
兼性异染色质(facultative heterochromatin) 194
减数分裂(meiosis) 254
减数分裂前间期(premeiotic interphase) 255
剪接体(spliceosome) 185
检测点(checkpoint) 204
简单序列重复(simple sequence repeats, SSRs) 186
碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) 273
交叉(chiasma) 211,259
交叉端化(terminalization) 259
角质蛋白(keratins) 172
酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YAC) 206
接合蛋白(adaptor protein) 293
接合器复合物(adaptor complex) 64
接合素(adaptin) 64
节段复制(segmental duplications) 186
结构异染色质(constitutive heterochromatin) 194
结合蛋白(binding protein, Bip) 88
结合改变机制(binding change mechanism) 129
解折叠酶(unfoldase) 133
巨型染色体(giant chromosome) 208
聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) 21
决定子(determinant) 287

K

卡尔文 - 本森循环(Calvin - Benson cycle) 145
颗粒组分(granular component, GC) 213
克隆羊多莉(Dolly) 342
孔蛋白(porin) 35
孔门运输(gated transport) 75
跨膜蛋白(transmembrane protein) 33
跨膜运输(transmembrane transport) 75

L

蓝氏贾第虫(*Giardia lamblia*) 360
老化(aging) 340
酪氨酸蛋白激酶(protein tyrosine kinase, PTK) 277,318,332
酪氨酸蛋白激酶受体 330
类病毒(viroid) 354
类囊体(thylakoid) 139
离子连接通道受体(ion - channel - linked receptor) 320
离子通道(ion channel) 49
离子载体(ionophore) 54
连接 DNA(linker DNA) 190
连接 G 蛋白受体(G - protein - linked receptor) 321
联会(synapsis) 256
联会复合体(synaptonemal complex, SC) 256
亮氨酸拉链结构模式(leucine zipper motif) 225
临界点干燥法(critical point drying, CPD) 15
磷脂(phospholipid) 28
磷脂调换蛋白(phospholipid exchange protein) 93
磷脂酶 C(phospholipase C) 273,326
磷脂转移蛋白(phospholipid transfer protein) 93
磷脂转移器(phospholipid translocator) 92
流式细胞术(flow cytometry, FCM) 14
流体镶嵌模型(fluid mosaic model) 27
螺线管模型(solenoid model) 193

螺旋－环－螺旋结构模式(helix－loop－helix motif, HLH) 227

M

马达蛋白(motor proteins) 170, 250, 251
酶连受体(enzyme－linked receptor) 330
门通道(gated channel) 49
蒙脱土(montmorillonite) 353
密度梯度离心(density gradient centrifugation) 19
膜的流动性(membrane fluidity) 37
膜电位(membrane potential) 54
膜间隙(intermembrane space) 122
膜运输蛋白(membrane transport protein) 48
末期(telophase) 246, 251

N

内分泌信号(endocrine signaling) 314
内共生作用(endosymbiosis) 361
内含子(intron) 216
内膜(inner membrane) 121
内膜系统(endomembrane system) 74
内吞作用(endocytosis) 59
内网器(internal reticular apparatus) 95
内信号肽(internal signal peptide) 87
内在蛋白(intrinsic protein) 27
内质网(endoplasmic reticulum, ER) 79
内着丝粒蛋白(inner centromere protein, INCENP) 202
囊泡化(vesiculation) 80
拟核(nucleoid) 361
鸟苷酸释放蛋白(guanine nucleotide releasing protein, GNRP) 293
鸟苷酸释放因子结合蛋白(guanine nucleotide releasing factor binding protein) 332
粘连蛋白复合物(cohesin complex) 250, 267

O

偶线期(zygotene stage) 256

P

旁分泌信号(paracrine signaling) 313
胚胎诱导(embryonic induction) 290, 291, 293, 295
配对结构域(pairing domain) 202
配体门通道(ligand－gated channel) 50
配子减数分裂(gametic meiosis) 254
破坏框(destruction box, D－box) 263

Q

启动点(start) 241
启动子(promoter) 219, 220, 223, 230
起始识别复合物(origin recognition complex, ORC) 243
牵拉假说(pull hypothesis) 248, 249
前复制复合物(pre－replication complex, pre－RC) 241, 242, 243
前期(prophase) 246
前中期(prometaphase) 246, 248
亲核蛋白(karyophilic proteins) 180
秋水仙素(colchicine) 165
驱动蛋白(kinesin) 170
趋异同源框基因(divergent homeobox gene) 365
群体(colony) 362
"全能"细胞(totipotent cell) 287

R

染色单体(chromatid) 201
染色单体连接蛋白(chromatid linking protein, CLIP) 202
染色粒(chromomere) 211, 256
染色体(chromosome) 183
染色体骨架(chromosome scaffold) 189, 195
染色体间复制(interchromosome duplication) 186
染色体内复制(intrachromosome duplication) 187
染色体学说(chromosome theory) 4
染色质(chromatin) 182, 183, 229
染色质纤维(chromatin fiber) 183
热休克蛋白(heat shock protein, HSP) 79
人工染色体(artificial chromosome) 205
人类基因组计划(Human Genome Project, HGP) 6
溶酶体(lysosome) 102, 361

S

三级溶酶体(tertiary lysosome) 104
三磷酸肌醇(inositol triphosphate IP_3) 326
扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM) 15

扫描式透射电子显微镜(scanning transmission electron microscope, STEM) 16
扫描隧道显微镜(scanning tunneling microscope, STM) 16
上游调控成分(upstream control element, UCE) 220
上游结合因子(upstream binding factor, UBF) 223
奢侈基因(luxury gene) 302
深海热泉(submarine hot spring) 352
神经蛋白纤维(neurofilaments) 172
神经递质(neurotransmitter) 313
神经生长因子(nerve growth factor, NGF) 273
生长因子(growth factor) 272
生物芯片(biochip) 6
识别颗粒(signal recognition particle, SRP) 85
识别螺旋(recognition helix) 224
始端减数分裂(initial meiosis) 254
视频反差增强显微镜术(video enhanced contrast microscopy, VEC) 13
受体(receptor) 315
受体蛋白(receptor protein) 65
受体的自磷酸化(autophosphorylation) 331
衰老(senescence) 204
双线期(diplotene stage) 259
双型性分子(amphipathic molecule) 28
顺式作用元件(*cis* - acting element) 219, 228
丝状微化石(filamentous microfossil) 351
酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF) 273
随体(satellite) 203
髓样体(myeloid body) 84
踏车模型(treadmilling model) 155
肽核酸(peptide nucleic acid, PNA) 355
碳质球粒陨石(carbonaceous chondrites) 352

T

糖萼(glycocalyx) 44
糖基磷脂酰肌醇锚[glycosylphosphatidylinositol (GPI)anchor] 35
糖皮质激素调节成分(glucocorticoid regulatory element, GRE) 229
糖脂(glycolipid) 28
调节外排途径(regulated exocytosis pathway) 66
铁硫蛋白(iron - sulfur protein) 122
停止转移肽(stop - transfer peptide) 86
停止转移信号(stop transfer signal) 86
通道蛋白(channel protein) 49
通用转录因子(general transcription factor) 221, 222, 223, 227, 230, 265
同源盒(homeobox) 297, 298
同源框基因(*Hox* gene) 365
同源染色体(homologous chromosome) 256
同源染色体识别区(homologous recognition region, HRR) 256
同源异形基因(homeotic selector genes, HOM genes) 297, 299
透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM) 15
团聚体(coacervate) 353
吞噬泡(phagocytic vesicle) 361
吞噬溶酶体(phago - lysosome) 103
吞噬作用(phagocytosis) 60, 361

W

外膜(outer membrane) 121
外排作用(exocytosis) 59, 65
外推假说(push hypothesis) 248, 249
外在蛋白(extrinsic protein) 27
微分干涉显微镜术(differential interference microscopy, DIC) 12
微管(microtubule) 164
微管蛋白(tubulin) 164
微管结合蛋白(microtubule associated proteins, MAPs) 164
微管连丝蛋白(nexin) 167
微管组织中心(microtubule - organizing center, MTOC) 166, 246
微极(mini poles) 247
微球体(microsphere) 353
微丝(microfilament, MF) 152
微丝结合蛋白(microfilament - associated protein) 156
微卫星(microsatellites) 186
位置效应(position effect) 292

X

细胞(cell) 2

细胞被(cell coat) 44
细胞表面受体(cell surface receptor) 60,320
细胞凋亡(apoptosis) 109,138,281,344,346
细胞分化(cell differentiation) 286,287,291,297,305,364
细胞骨架(cytoskeleton) 152
细胞决定(cell determination) 286,287,288,289
细胞膜(cell membrane) 26,356
细胞内信号转导子(intracellular signal transducers) 277
细胞培养(cell culture) 16
细胞融合(cell fusion) 17
细胞色素(cytochrome, Cyt) 122
细胞色素 bf 复合物(cytochrome bf complex) 140
细胞衰老(senescence) 340
细胞松弛素 B(cytochalasin B) 155
细胞同步化(synchronization of cells) 237
细胞外基质(extracellular matrix) 44
细胞学说(cell theory) 2,3
细胞质定域(cytoplasm locolization) 287
细胞质基质(cytoplasmic matrix, cytomatrix) 77
细胞周期(cell cycle) 236
细胞周期检验点(cell cycle checkpoint) 240,270,282
细胞周期引擎分子(engine) 241,261,282
细菌域(Bacteria) 358
细线期(leptotene stage) 256
纤毛(cilia) 167
纤维冠(fibrous corona) 202
纤维中心(fibrillar centers, FC) 213
显微分光光度术(microspectrophotometry) 14
线粒体(mitochondrion) 119,361
线粒体 DNA(mtDNA) 130,132,136,138
限制点(restriction point) 240
限制性内切核酸酶 21,23
腺苷酸环化酶(adenylyl cyclase) 323
相差显微镜术(phase contrast microscopy) 12
小的核 RNA(small nuclear RNA, snRNA) 185
小卫星(minisatellite) 186
小的核仁 RNA(small nucleolar RNA, snoRNA) 185
协同翻译的转移(co-translational translocation) 86
协同运输(co-transport) 58
锌指型结构模式(zinc finger motif) 225
信号斑(signal patch) 76,104
信号分子(signal molecule) 315
信号假说(signal hypothesis) 84
信号肽(signal peptide) 76
信号肽酶(signal peptidase) 76
信号序列(signal sequence) 84
信号转导(signal transduction) 312
星体(aster) 246,247
星体微管(astral microtubles) 246
胸腹复合物(bithorax complex, BX-C) 297
序列特异性 DNA 结合蛋白(sequence-specific DNA-binding protein) 189
旋转模型(rotational model) 129
选择拼接(alternative splicing) 185
选择因子(selectivity factor 1, SL1) 223
血红素(heme) 123
血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF) 272
循环式光合磷酸化(cyclic photophosphorylation) 145

Y

有丝分裂原活化蛋白(mitogen-activated protein, MAP) 334
压力激活通道(stress-activated channel) 51
亚端粒区(subtelomeric region) 186
亚线粒体颗粒(submitochondrial particles) 125
叶绿体(chloroplast) 119,138,361
叶绿体 DNA(chloroplast DNA) 148
叶绿体外被(chloroplast envelope) 139
液泡系统(vacuolar system) 80
移动素类蛋白(kinesin-related proteins, KRPS) 247
乙醛酸体(glyoxysome) 113
乙醛酸循环(glyoxylate cycle) 113
异染色质(heterochromatin) 194,229
异形胞(heterocyst) 362
抑癌基因(tumor suppressor gene) 261,280
缢缩环(contractile ring) 252
遗传系统(genetic system) 356
应力纤维(stress fiber) 163
荧光显微镜术(fluorescence microscopy) 13

有被小囊(coated vesicles) 60,61
有被小窝(coated pits) 60,61
有丝分裂装置(mitotic apparatus) 246
原癌基因(proto－oncogene) 276,278
原初反应(primary reaction) 141,319
原核生物(prokaryote) 358
原核细胞(prokaryocyte) 358
原肌球蛋白(tropomyosin) 156
原生体(protobion) 351
原生质(protoplasm) 3
原始细胞(progenote) 351

Z

杂交瘤(hybridoma) 20
杂种细胞(hybrid cell) 17,20
甾类激素受体(steroid hormone receptor) 319
载体蛋白(carrier protein) 53
早熟染色体凝集(premature chromosome condensation, PCC) 261
增强子(enhancer) 219
增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 270
真核生物(eukaryote) 358
真核细胞(eukaryocyte) 358
真核域(Eukarya) 358
真细菌(Eubacteria) 358
整合蛋白(integral protein) 27
脂质体(liposome) 31
植物血凝素(lectin) 45
质粒(plasmid) 23
质膜(plasma membrane, plasmalemma) 26
质子泵(proton pump) 102
质子动力势(proton motive force, ΔP) 127
致密纤维组分(dense fibrillar component, DFC) 213
中等纤维(intermediate filament, IF) 171
中间减数分裂(intermediate meiosis) 254
中期(metaphase) 246,248
中体(midbody) 252
中心粒(centriole) 166,246
中心粒周围物质(pericentriolar material, PCM) 246
中心栓(central plug) 178
中心体(centrosome) 246
中央结构域(central domain) 202
终变期(diakinesis stage) 259
终端减数分裂(terminal meiosis) 254
周期蛋白(cyclin) 240,261,263,280
周期蛋白框(cyclin box) 263
周期蛋白依赖激酶(cyclin－dependent kinase, Cdk) 241
周缘蛋白(peripheral protein) 27
主动运输(active transport) 56
主缢痕(primary constriction) 202,264
转导(transduction) 276
转化生长因子 β(transforming growth factor－β, TGFβ) 273
转录激活结构域(transcription activating domain) 224,227
转录因子(transcription factor) 221,223,228,229
"专能"细胞(monopotent cell) 287
转移成分(transitional elements) 83
转移信号(transfer signal) 86
转运器(transporter) 178
转座因子(transposable elements) 185
着丝粒(centromere) 201
着丝粒 DNA 序列(centromere DNA sequence, CEN) 205
着丝粒指数(centromere index) 201
着丝粒周区(pericentromeric region) 186
姊妹染色单体(sister chromatid) 201,249
紫杉酚(taxol) 165
自动催化(autocatalysis) 147
自分泌信号(autocrine signaling) 313
自分泌(autocrine) 277
自溶作用(autolysis) 108
自噬溶酶体(autophagic lysosome) 104
自体吞噬(autophagy) 107
自我剪接(self－splicing) 216
自养生物(autotrophic organism) 351
自主复制 DNA 序列(autonomously replicating sequence, ARS) 205
组成外排途径(constitutive exocytosis pathway) 65
组蛋白(histone) 188,230
组合调控(combinatorial control) 307,309
组织工程(tissue engineering) 8
组装(assembly) 134

作用中心(reaction centre) 142
座位控制区域(locus control region, LCR) 306
6－磷酸甘露糖(mannose－6－phosphate, M6P) 100
ABO 血型 47
ATP 合酶(ATP synthase) 125, 127, 128
ATP－驱动泵(ATP driven pump) 56
B 淋巴细胞 20
cAMP 依赖性蛋白激酶(PKA) 324
cAMP 应答元件(cAMP response element, CRE) 325
Ca^{2+} 泵(Ca^{2+}－pump) 58
Cdk 激酶(cyclin－dependent kinase) 240, 261
Cdk 激酶结构域(Cdk kinase domain) 263
Cdk 抑制因子(Cdk inhibitors, CKIs) 269
CF_0－CF_1ATP 合酶(CF_0－CF_1ATP synthase) 141
chla/b 捕光复合物(chla/b light－harvesting complex) 141
C－Myc 蛋白 218
COPⅠ被小囊(COPⅠ coated vesicle) 102
COPⅡ被小囊(COPⅡ coated vesicle) 100
C 值矛盾现象(C－value paradox) 184
DNase I 超敏感位点(hypersensitive sites) 231, 306
DNA 的构象(conformation) 187
DNA 调节序列(regulatory DNA sequences) 219
DNA 调节序列结合的基因调节蛋白(gene regulatory protein) 221
DNA 复制检验点(DNA replication checkpoint) 240
DNA 复制起始序列(DNA replication origin sequence) 205
DNA 复制体(replisome) 218
DNA 结合结构域(DNA binding domain) 224
DNA 顺式元件 279
DNA 指纹(DNA finger－printing) 186
DNA 转座子(DNA transposon) 186
ER 保留信号(ER retention signal) 88
ER 驻留蛋白(ER resident protein) 88
F_0F_1ATPase 125
GTP 结合蛋白(GTP－binding protein) 85, 101, 181, 322
GTP 酶活化的蛋白(GTPase－activating proteins, GAPs) 331
G 蛋白 321
G_1 期 241
HMG(high mobility group)框结构模式(HMG－box motif) 227
HOM 基因 298, 299
Hox 复合物(*Hox* complex, *Hox*－C) 298
Hox 基因 298, 299
LTR－反转座子(LTR－retroposon) 185
M6P 受体 104
MAP 激酶 334
MCM 蛋白(mini－chromosome maintenance proteins) 243
MEK－MAPK 信号通路 278
MN 血型 47
M 期促进因子(M phase promoting factor, MPF) 262
M 期周期蛋白(cyclin B、cyclin A) 263
Na^+－K^+ 泵(Na^+－K^+ pump) 56
NLS 受体(又称 importin) 181
N－连接的寡糖(*N*－linked oligosaccharides) 89
O－连接的寡糖(*O*－linked oligosaccharides) 91
PSⅠ复合物(photosystem Ⅰ complex) 140, 142
PSⅡ复合物(photosystemⅡcomplex) 140
Rab 蛋白 67
Rab 效应物(Rab effector) 67
RNA 世界(RNA world) 354
RuBP 羧化酶加氧酶(ribulose－1, 5－bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco) 147
SH2 和 SH3 结构域 332
SNARE 蛋白家族(SNARE protein family) 68
SRP 受体(SRP receptor) 85
S 期促进因子(S phase－promoting factor, SPF) 241
Taq DNA 22
TATA 框(TATA box) 220
Z 链(Z－scheme) 143
α 螺旋－转角－α 螺旋结构模式(helix－turn－helix motif) 224
β 筒(β－barrel) 35

[General Information]
书名=细胞生物学
作者=刘凌云著
页数=375
SS号=10933702
出版日期=2002年